

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю**  
**Кафедра біотехнології і мікробіології**

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту(декан факультету)  
Наталія ГРЕГІРЧАК  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«     »     лютого     20        р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
Віктор СТАБНІКОВ  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«     »     лютого     20        р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

Зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код та назва спеціальності)  
освітньо-професійної програми «Промислова біотехнологія»

на тему: Використання потенціалу бактерій роду *Pseudomonas* для  
знешкодження нафтових розливів в морських акваторіях

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 1

ФІЛЬ Ірина Андріївна  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали) (підпис)

Я як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ - 20        р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) ) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»  
(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології  
і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 30 ” листопада 2023 року

## З А В Д А Н Н Я

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ФІЛЬ Ірини Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Використання потенціалу бактерій роду *Pseudomonas*  
для знешкодження нафтових розливів в морських акваторіях

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович к.т.н., доц.,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року  
№ 913-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи *Pseudomonas aeruginosa*, біопрепарат на основі  
біомаси мікроорганізмів, нафта та нафтопродукти, ферментер об'ємом 1000 л

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)  
Літературний огляд, техніко-економічне обґрунтування, обґрунтування  
вибору післяферментаційних процесів, підбір технологічно обладнання з  
урахуванням матеріальних потоків по стадіям, специфікація обладнання,  
контроль виробництва, проект технічних умов на випуск товарної форми  
цільового продукту

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 1 аркуш (A1), Апаратурна схема – 1 аркуш (A2)

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_ 30 жовтня 2023 \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	01.11.2023 – 14.11.2023	
2	РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	14.11.2023 – 20.11.2023	
3	РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	20.11.2023 – 28.11.2023	
4	РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНО ОБЛАДНАННЯ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯМ	28.11.2023 – 06.12.2023	
5	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	06.12.2023 – 14.12.2023	
6	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА	14.12.2023 – 22.12.2023	
7	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	22.12.2023 – 03.01.2024	
8	РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	03.01.2024 – 13.01.2024	
9	Оформлення графічної частини	13.01.2024 – 20.01.2024	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Ірина ФІЛЬ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Олександр ВОРОНЦОВ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології біосинтезу біопрепарату для очистки води від нафти та нафтопродуктів на основі біомаси мікроорганізмів. Біосинтез відбувається за участі бактерії *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. Культивування даного мікроорганізму відбувається на поживному середовищі з вмістом сирової нафти як джерела вуглецю.

Біопрепарати являють собою масу життєздатних клітин мікроорганізмів-бiodеструкторів і розрізняються штамми, що використовуються для їх отримання, які характеризуються різними фізіолого-біохімічними властивостями, такими як термотолерантність, осмофільність, оптимальні для зростання значення рН, здатність включати в метаболічні процеси класи вуглеводів та спектри n-алканів.

Розрахована річна потужність відповідно до зібраної статистики з найбільших нафтових розливів у акваторії Чорного моря за останні роки.

Технологічний процес складається відокремлення біомаси, змішування біомаси із біологічними носіями, сушіння препарату, подрібнення та просіювання препарату та його пакування, що наведені в технологічній та апаратурній схемах

Кваліфікаційна робота містить 92 сторінок друкованого тексту, 11 таблиць, 10 рисунків і складається з вступу, літературного огляду, 8 розділів, списку використаних джерел (54 джерела), додатків та графічної частини (два креслення формату А1).

**Ключові слова:** біомаса, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514, біопрепарати, виділення.

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Філь І.А.				РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Воронцов О.О.						4	92
Рецензент						Кафедра БТМ <sup>4</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

## ЗМІСТ

РЕФЕРАТ .....	4
ВСТУП .....	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1. Характеристика забруднення водних ресурсів нафтою та нафтопродуктами.....	9
1.2 Втрати екологічної стабільності в місцях розливу нафти в морських акваторіях.....	10
1.3. Сучасні методи очищення водних об'єктів від нафти та нафтопродуктів.....	11
1.4 Мікроорганізми – потенційні деструктори нафтових забруднень..	13
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ.....	20
2.1. Потреба у цільовому продукті.....	22
2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту.....	23
2.3. Розрахунок річної потужності виробництва.....	27
2.4 Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту... 31	
2.4.1. Обґрунтування форми випуску препарату .....	31
2.4.2. Обґрунтування вибору упаковки.....	32
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ .....	34
3.1. Обґрунтування способу відокремлення біомаси.....	35
3.2. Обґрунтування способу сушіння.....	40
3.3 Обґрунтування вибору стадій отримання товарної форми..	43
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНО ОБЛАДНАННЯ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯМ.....	46
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ .....	48
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА.....	50
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	53

7.1. Мікробіологічний контроль.....	53
7.2. Концентрація біомаси.....	55
7.3. Аналіз біодеградації сирової нафти .....	55
7.4. Контроль отриманого продукту .....	56
7.4.1. Визначення вологості .....	56
7.4.2. Визначення кількості життєздатних клітин .....	58
РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	61
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	71
ДОДАТКИ.....	80

## ВСТУП

Нафта є одним з найважливіших сировинних матеріалів для виробництва нафтових палив (наприклад бензину та гасу) та продуктів хімічних реагентів (наприклад фармацевтичних препаратів, розчинників, добрив та пластмас) (Хуе J, 2015).

У зв'язку зі зростанням світового попиту на нафту, здійснюється дедалі більше таких видів діяльності, як видобуток, переробка та транспортування нафти. При цьому близько половини цих нафтопродуктів транспортується світом морським шляхом (Вовіо Е, 2017). Отже, у всьому світі спостерігається різке збільшення аварій з розливами або витокami нафти, таких як розливи з нафтових свердловин, трубопроводів, бурових установок чи транспортних танкерів.

Що важливіше, ці аварії з розливом нафти можуть спричинити серйозну фізичну, хімічну та біологічну небезпеку для місцевого морського середовища.

На сьогодні розроблені різні методи очищення та відновлення розливів нафти, у тому числі фізичні (наприклад контрольоване спалювання, збирання та абсорбція), хімічні (наприклад диспергування та затвердіння) та біоремедіаційна обробка (Mnif S, 2014; Jiang WJ, 2014). Як правило, фізичні та хімічні методи слід застосовувати як екстрені заходи. Наприклад, на початку аварії з розливом нафти вживаються фізичні та хімічні заходи для швидкого контролю дифузії та дрейфу нафти. Ці методи не підходять для екологічної реставрації.

НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Філь І.А.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Воронцов О.О.				7	92
Рецензент					<b>Кафедра БТМ<sup>7</sup></b>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

ВСТУП

Біоремедіація розглядається як одна з найважливіших екологічно безпечних та економічно ефективних технологій відновлення морської екології, що призводить до повного розкладання складних нафтових вуглеводнів розлитої нафти до нетоксичних сполук. У процесі біоремедіації відповідні мікроорганізми необхідні для біотрансформації/біодеградації забруднювача (Wang C, 2018; Xue J, 2015).

Важливу роль у розкладанні нафти у морському середовищі відіграють наступні види мікроорганізмів: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Archrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Coryneforms*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Actinomycetes*, *Nocardia*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* та *Sporobolomyces* (Бао МТ, 2012; Prince RC, 2013; Xue J, 2015). Окрім того, деякі види грибів, а саме *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* та *Penicilium* (Simister RL, 2015; Xue J, 2015).

**Актуальність:** Нафта та нафтопродукти є пріоритетними забруднювачами біосфери, зокрема морських акваторій. Використання препаратів на основі біомаси мікроорганізмів для очищення є перспективним та має ряд переваг над іншими видами очищення.

**Новизна:** Використання в якості біологічного носія для *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 суміш із торфу, подрібнених ступок мідій, піску морського та подрібнених водоростей. Завдяки різній питомій вазі складових носія бактерії поступово опускаються на дно, що дозволяє сорбувати і деструктувати вуглеводні нафти не лише з поверхні, а й зі всієї товщі водяного шару і дна водоймищ та дозволяє отримати 100% біодеградації нафтового забруднення водойми.

## РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1 Характеристика забруднення водних ресурсів нафтою та нафтопродуктами

Нафта і нафтопродукти є найбільш поширеними забруднюючими речовинами у Світовому океані. За даними міжнародної організації ІМСО, загальна кількість нафти і нафтопродуктів, що потрапляють щорічно у води Світового океану досягає 10 млн. т (MARPOL 73/78).

Найбільші втрати нафти пов'язані із переміщенням її із місць видобування. Аварійні ситуації, злив танкерами за борт промивочних та баластових вод, - все це обумовлює постійну наявність полів забруднення на трасах морських шляхів

Джерела забруднення довкілля нафтопродуктами *Таблиця. 1.1.*

Переробка	Викиди газоподібних та рідких нафтових складових через негерметичність устаткування
	Стічні, продувні та зворотні води нафтопереробних заводів
	Газоподібні викиди продуктів переробки нафтопродуктів
Використання	Великі та малі викиди з резервуарів зберігання нафтопродуктів згорання нафти і її похідних з двигунів
	Викиди продуктів згорання нафти і її похідних з двигунів
	Стічні води від промивки механізмів, забруднених нафтопродуктами і мастилами
Транспортування	Забруднення викидами і скидами автомобільного, залізничного і морського транспорту
	Викиди при аваріях на морському та трубопровідному транспорті
Видобування	Забруднення нафтопродуктами ґрунтів, підземних і поверхневих вод при видобуванні
	Забруднення атмосфери викидами газоподібних нафтопродуктів разом з попутним газом

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Філь І.А.				РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Воронцов О.О.						9	92
Рецензент						Кафедра БТМ <sup>9</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

## 1.2 Втрати екологічної стабільності в місцях розливу нафти в морських акваторіях

Присутність нафтопродуктів у водному об'єкті приводить до пригнічення водної флори і фауни за рахунок загального погіршення якості води (зміни величини рН, кольоровості, появи специфічного присмаку і запаху). Ці зміни обумовлені наявністю у водному середовищі як нафтопродуктів, так і продуктів їх хімічного і біохімічного окиснення, токсичність яких часто перевищує токсичність початкових нафтопродуктів.

Вуглеводні, що знаходяться у водному об'єкті, вступають в складні взаємодії з екосистемою: з одного боку, нафта впливає на біоту як токсикант, а з іншою – гідробіонти впливають на нафту, здійснюючи процес її трансформації.

Негативний вплив нафтопродуктів, особливо плівкових, в концентраціях 0,001 – 10 мг/дм<sup>3</sup> позначається на розвитку вищої водної рослинності (Southward AJ, Langmead O та ін., 2015).

Токсична дія нафти і нафтопродуктів на зоопланктон наголошувалася при концентрації 0,001 мг/дм<sup>3</sup>. При концентрації нафтопродуктів, на рівні 0,1 мг/дм, зоопланктон гине (Cusso A, Rindi L та ін., 2023).

Для водних організмів нафта і нафтопродукти є високотоксичними речовинами і відносяться до групи нервово-паралітичних отрут.

Вуглеводні нафти є в основному згубними для ранніх стадій розвитку гідробіонтів і не приводять до швидкого і масового вимирання дорослих організмів. Для ікри, памолоді риб і ракоподібних згубною виявляється концентрація нафти всього лише в 0,1 – 0,01 мг/дм<sup>3</sup>, тоді як на дорослі організми така концентрація не дає токсичну дію (Yaghmour F, Els J та ін., 2022).

### 1.3 Сучасні методи очищення водних об'єктів від нафти та нафтопродуктів

Ліквідація наслідків аварійних розливів нафти здійснюється, як правило, у два етапи.

Етап 1 - механічний. Забезпечує ліквідацію джерела забруднення, і збір основної маси нафти, що розлилася. На воді встановлюються бони, на невеликих річках створюються водонепроникні греблі із гідрозатворами та багатокаскадними нафтовими пастками. Збір основної маси нафти, що розлилася, здійснюється в основному механічним способом з використанням спеціальної техніки або вручну, що є трудомістким і витратним за часом процесом (Dordevic, M., Sabalja, D., та ін., 2022; Li, P., Qiao, Y., та ін., 2015).

При низьких температурах води багато нафтопродуктів, включаючи сиру нафту і мазут, утворюють в'язкі конгломерати, які швидко засмічують скімери, приводячи їх у неробочий стан. Крім того, нафтові конгломерати через кілька годин після аварії починають тонути, безповоротно руйнуючи екосистеми донних відкладень. У зимових умовах більшість із вживаних збирачів покриваються льодом.(Dordevic, M., Sabalja, D., та ін., 2022)

Слід зазначити, що застосування на даному етапі очищення водної поверхні тонучих сорбентів або сорбентів з обмеженою плавучістю (до 72 год) недоцільно, оскільки це неминуче призведе до створення «депо» нафтопродукту в донних відкладах, що, у свою чергу, значно ускладнить та підвищить вартість біоремедіації нафтозабрудненої водойми (Li, P., Qiao, Y., та ін., 2015; Hoang, A. T., Nguyen, X. P., та ін., 2021).

Збір забруднювача з берегової лінії в залежності від особливостей рельєфу та наявності рослинності здійснюється найчастіше без застосування техніки.

Етап 2 – застосування нафтових сорбентів. Після збору основного обсягу нафти завжди залишається її значна кількість, що негативно впливає на біоценоз забрудненої ділянки. При цьому, видалення нафти, що міститься в донних відкладах і на прибережній рослинності, пов'язане з великими труднощами і неможливо, як правило. без застосування нафтових сорбентів (Rajaković-Ognjanović, V., та ін., 2012).

При очищенні поверхні води особливу складність представляє сорбція тонких так званих «райдужних» плівок, які, поряд із загальнотоксичною дією, перешкоджають надходженню кисню, що призводить до загибелі біологічних організмів у нафтозабрудненій водоймі (Zamparas, M., Tzivras, D., та ін., 2020).

В даний час у світі виробляється або використовується для ліквідації розливів нафти більше двох сотень різних сорбентів, які поділяють на неорганічні, природні органічні та органомінеральні, а також синтетичні. Якість сорбентів визначається головним чином їх ємністю по відношенню до нафти, ступенем гідрофобності, плавучістю після сорбції нафти, можливістю десорбції нафти, регенерації або утилізації сорбенту.

- Неорганічні сорбенти. До них відносять різні види глин, діатомітові породи (головним чином рихлий діатоміт кізельгур), пісок, цеоліти, туфи пемзу тощо (Wahi, R., Chuah, L. та ін., 2013).
- Синтетичні сорбенти. Виготовляють з поліпропіленових волокон, що формуються в неткані рулонні матеріали різної товщини (Laitinen, O., Suorajärvi, T., та ін., 2017).
- Природні сорбенти. Є найперспективнішим видом сорбентів для ліквідації нафтових забруднень. Найчастіше застосовують деревну тріску та тирсу, модифікований торф, шерсть, макулатуру. Одним з кращих природних сорбентів, який можна порівняти за своєю нафтоємністю з модифікованим торфом є вовна. Вона може поглинути

до 8 - 10 т нафти на т своєї маси, при цьому природна пружність вовни дозволяє віджати більшу частину легких фракцій нафти. Однак після кількох таких віджимань вовна звалюється в бітумінізовану повсть і стає непридатною для використання. Висока ціна вовни, недостатня її кількість і суворі вимоги до зберігання (вовна дуже приваблює гризунів, комах, зазнає біохімічних перетворень) не дозволяють вважати її скільки-небудь перспективним масовим нафтовим сорбентом (Wolok, E., Barafi, J., 2020; Sabir, S. 2015).

Загальним недоліком вищеназваних сорбентів є необхідність їх подальшого збору, який дуже трудомісткий, вимагає спеціальних засобів і практично неможливий при значному хвилюванні водної поверхні. Практика роботи ліквідаторів нафтових розливів, які використовують сорбенти, показує, що в більшості випадків не вдається зібрати більше 25 % нанесеного на водну поверхню сорбенту. До факторів, що ускладнюють застосування зазначених вище сорбентів, відноситься відсутність технології та обладнання для їх утилізації шляхом спалювання (Cojocaru, C., Macoveanu, M., Cretescu, I. 2011).

Отже, існує необхідність у пошуку методів очистки нафтових розливів, що не потребують подальшого збору та утилізації.

#### **1.4 Мікроорганізми – потенційні деструктори нафтових забруднень**

Maity JP із співавторами проаналізували виділені аборигенні бактеріальні штами у порт Гаосюн, Тайвань, та визначили найефективніші з них. Бактерії *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW1), *Staphylococcus saprophyticus* (CYCTW2) та *Bacillus megaterium* (CYCTW3), використовували для розкладання олії та UCM за допомогою періодичного експерименту.

Для проведення експерименту з біорозкладу виділені місцеві бактеріальні штами інокулювали в маслянистому культуральному середовищі (4 мкл дизельного палива змішаного з 40 мл середовища з

морською водою) та інкубували на шейкері при 27 °C протягом 72 годин (для видалення нафти/UCM).

За результатами було визначено, що місцеві штами успішно розкладали дизельне паливо з числом атомів вуглецю C<sub>10</sub>-C<sub>30</sub>, а також UCM, які складаються з двох частин: C<sub>24</sub> і C<sub>24+</sub> (Maity JP, Huang YH, Lin HF, Chen CY 2021).

Ganesh Kumar A, Nivedha Rajan N із співавторами з морських відкладень, зібраних на глибині 2 100 м, виділили гідрокарбонатокластичний бактеріальний консорціум, що використовує сирю нафту як джерело вуглецю та енергії.

Молекулярна характеристика генів послідовностей 16S рРНК підтвердила, такі ізоляти, як *Oceanobacillus sp.*, *Nesiotobacter sp.*, *Ruegeria sp.*, *Photobacterium sp.*, *Enterobacter sp.*, *Haererehalobacter sp.*, *Exiguobacterium sp.*, *Acinetobacter sp.* та *Pseudoalteromonas sp.*

Самоімобілізований консорціум розклав більше 85% всіх вуглеводнів після 10 днів інкубації з 1% (об./об.) сирої нафти та 0,05% (об./об.) Tween 80 (поверхнево-активна речовина) при 28 ± 2°C. З додавання джерел азоту і фосфору окремо, тобто. 0,1% (об./об.) CO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> або K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, збільшило відсоток використання вуглеводнів (Ganesh Kumar A, Nivedha Rajan N 2019).

Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA у своїй роботі виділили двадцять вісім бактерій, що розкладають сирю нафту, з трьох видів мідій, зібраних у забруднених нафтою районах Перської затоки.

Відповідно до високого зростання і розкладання сирої нафти чотири штами були відібрані з 28 ізолюваних штамів для подальшого вивчення. Визначення нуклеотидної послідовності гена, що кодує 16S рРНК, показує, що ці виділені штами належать: ізоляту водоростей *Shewanella* ВНА1, ізоляту *Micrococcus luteus* ВНА7, *Pseudoalteromonas sp.* ізолят ВНА8 та ізолят

*Shewanella haliotis* ВНА35. Залишкову сиру нафту в культуральному середовищі аналізували за допомогою газової хроматографії (ГХ).

Результати підтвердили, що ці штами можуть розкласти: 47,24%, 66,08%, 27,13% та 69,17% сирої нафти відповідно. Ці штами мали високу емульгуючу активність та продукцію біосурфактанту. Також вивчався вплив деяких факторів на деградацію сирої нафти ізольованих штамів. Результати показують, що оптимальна концентрація сирої нафти становить 2,5%, а найкраща деградація відбувається при 12% солоності (Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA 2015).

Simister RL, Routasse CM та ін. досліджували гриби типу *Ascomycota*, що були виділені з просочених нафтою піщаних плям, зібраних із пляжів після розливу нафти на платформі Deepwater Horizon.

Ізоляти грибів вирощували на замасленому кварці при 20°C, 30°C та 40°C. Всі досліджувані ізоляти розкладали різні кількості нафти (32-65%). Ізоляти грибів переважно розкладали коротколанцюгові (<C<sub>18</sub>; 90–99%) порівняно з довголанцюговими (C<sub>19</sub>–C<sub>36</sub>; 7–87 %) n-алкани та C<sub>17</sub>- та C<sub>18</sub>-n-алкани з прямим ланцюгом (91-99%) в порівнянні з їх розгалуженими аналогами пристан і фітан (70-98%).

Поєднання поліциклічних ароматичних вуглеводнів також розкладалися грибковими ізолятами (42–84% загальної кількості тих, що розклалися), при цьому перевага надавалася ПАВ з низькою молекулярною масою порівняно з тими, що мають високу молекулярну масу (Simister RL, Routasse CM та ін., 2015).

У дослідженні Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M п'ять штамів бактерій, зокрема *Exiguobacterium* sp. ASW-1, *Pseudomonas aeruginosa* ASW-2, *Alcaligenes* sp. ASW-3, *Alcaligenes* sp. ASS-1 та *Bacillus* sp. ACC-2, були ізольовані із узбережжя Чжецзян в Китаї. Змішана флора п'яти штамів

показала добрі результати. із розкладанням 75,1% сирової нафти (1% за масою) за 7 днів.

У якості носія для іммобілізації бактеріального консорціуму використовували альгінат кальцію - активоване вугілля. Іммобілізовані клітини поводитися краще, ніж вільні, у варіаціях факторів зовнішнього середовища, що містять інкубовані клітини. температура, початковий рН, солоність середовища та концентрація сирової нафти.

Процес переробки сирової нафти іммобілізованими бактеріями був пришвидшений порівняно з вільним бактеріальним консорціумом та показав кращі результати у біодеградації нормальних алканів ніж у ПАВ (Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M, 2017).

Lee DW та Kwon BO із співавторами досліджували мікробіоту виділену з відкладень пляжу Теан, для пошуку найкращих продуцентів біосурфактантів Бактерії було відібрано шляхом скринінгу біохімічних тестів. Вибрані бактерії включають *Bacillus algicola* 003-Phe1, *Rhodococcus soli* 102-Na5, *Isoptericola chiayiensis* 103-Na4 та *Pseudoalteromonas ivorans* SDRB-Py1.

Ізольовані мікроорганізми показали низькі значення поверхневого натягу, високий показник розтікання нафти (1,2-2,4 см) та емульгування вуглеводнів (до 65%), що гарантує активну деградація вуглеводнів. Аналізи FT-IR та LC-MS показали, що монорамноліпід (Rha C<sub>16:1</sub>) та дирамноліпід (Rha-Rha-C<sub>6</sub>-C<sub>6:1</sub>) продукуються бактеріями як потужні біоповерхнево-активні речовини.

Залишкову сирю нафту після тесту біорозкладання визначали кількісно за допомогою аналізу ГХ-МС. Бактерії використовували сирю нафту як єдине джерело вуглецю, тоді як кількість залишкової сирової нафти значно знизилась (Lee DW, Lee H, Kwon BO та ін. 2018).

Murphy SMC, Bautista MA, Cramm MA, Hubert CRJ досліджували реакцію мікробіоти узбережжя Лабрадора, Канада на можливий розлив нафти у регіоні. Для цього зразки морських відкладень, доповнені дизельним паливом або сирою нафтою інкубували при температурі 4°C протягом декількох тижнів.

Секвенування генів 16S рРНК після моделювання цих розливів виявило зниження мікробної різноманітності та збагачення передбачуваних гідроокластичних бактерій, які відрізнялися в залежності від нафтопродукту. Метагеномне секвенування показало, що *Paraperlucidibaca* має раніше невідомі здібності до біорозкладання алканів, які також спостерігалися у *Cycloclasticus*. Спільне секвенування геному та амплікону дозволяє припустити, що *Olespira* та *Thalassolituus* розкладали алкани з дизельного палива, в той час як *Zhongshania* сприяли біорозкладанню алканів у сирій нафті.

Втрати ПАВ із сирої нафти вищі, ніж із дизельного палива, що узгоджуються з тим, що геноми *Marinobacter*, *Pseudomonas* і *Amphritea* мають потенціал біодеградації ароматичних вуглеводнів.

Біостимуляція азотом та фосфором (4,67 мМ NH<sub>4</sub>Cl та 1,47 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) була ефективна у посиленні розкладання н-алканів та ПАВ після низькоконцентрованих (0,1% [об.]) добавок до дизельного палива та сирої нафти, у той час як при більш високих концентраціях (1 %[об./об.]) споживалися тільки н-алкани в дизельному паливі, що свідчить про токсичність, спричинену сполуками у неочищеній сирій нафті (Murphy SMC, Bautista MA, Cramm MA, Hubert CRJ, 2021).

Wang C, Liu X та інші досліджували біодеградацію сирої нафти мікроорганізмами, спільно інкубованих з відкладеннями, зібраними з нафтової платформи Пенлай 19-3, Бохайське море, Китай. Також

обговорювалася відносна сприйнятливість ізомерів алкілнафталінів, алкілфенантренив та алкілдибензотіофену до біорозкладання.

Результати показали, що відносні значення розкладання загальної кількості нафтових вуглеводнів становлять 43,56% та 51,29% для відкладень з необробленими мікрокосмами (S-BR1) та обробленими поверхнево активними речовинами мікрокосмами (SBR2) відповідно.

Результати біорозкладу нафтових вуглеводнів показали очевидне зниження вмісту насичених сполук (швидкість біорозкладання: 67,85–77,29%) та незначне зниження вмісту ароматичних сполук (швидкість біорозкладання: 47,13–57,21%), у той час як суттєвої різниці між смолами та асфальтенами виявлено не було.

Ефективність біодеградації алкілнафталінів, алкілфенантренив та алкілдибензотіофену для зразків S-BR1 і S-BR2 досягає 1,28–84,43% і 42,56–86,67% відповідно. Ефективність розкладання сирої нафти в осаді з обробленими ПАВ культурами мікрокосмів з додаванням Tween 20 була вищою, ніж в осаді з необробленими мікрокосмами (Wang C, Liu X, Guo J, Lv Y, Li Y, 2018).

Li X, Zhao L, Adam M працювали над створення ефективного бактеріального консорціуму для біорозкладання сирої нафти, розлитої в Бохайському морі у Китаї.

У цьому дослідженні TCOB-1 (*Ochrobactrum*), TCOB-2 (*Brevundimonas*), TCOB-3 (*Brevundimonas*), TCOB-4 (*Bacillus*) та TCOB-5 (*Castellaniella*) були виділені із затоки Бохай.

Аналіз біодеградації вуглеводнів показав, що TCOB-4 біорозкладає більше н-алканів із середнім ланцюгом (від C<sub>17</sub> до C<sub>23</sub>) та н-алканів з довгим ланцюгом (C<sub>31</sub>–C<sub>36</sub>). TCOB-5 здатний розкласти більше н-алканів, включаючи C<sub>24</sub>–C<sub>30</sub> та ароматичні сполуки. На основі додаткових переваг

ТСОВ-4 та ТСОВ-5 були обрані для створення консорціуму, здатного розкласти близько 51,87% сирої нафти (2% ваг./об.) після 1 тижня інкубації в сольовому розчині МСМ (3% NaCl) (Li X, Zhao L, Adam M, 2016).

Michaud L, Lo Giudice A та інші виділили та дослідили два штами психротрофних бактерій *Arthrobacter agilis* E28 та *Rhodococcus luteus* E60, виділених з морських вод Антарктики (море Росса, Антарктида), на предмет їх здатності розкласти промислове дизельне паливо.

Ефективність утилізації вуглеводнів вивчали при 4 і 20°C протягом двох місяців. Штами культивували на мінеральному рідкому середовищі, доповнене дизелем як єдиним джерелом вуглецю та енергії. Ефективність біодеградації була вищою при 20 °C, ніж при 4 °C для обох штамів, а також зниження концентрації вуглеводнів досягла понад 85% після 60 днів інкубації при 20 °C (Michaud L, Lo Giudice A, Saitta M, De Domenico M, Bruni V 2014).

Uribe-Flores MM, Cerqueda-García D та інші у своїй роботі досліджували мікробне співтовариство під час експерименту щодо розкладання легкої сирої нафти.

Бактеріальна спільнота ефективно видалила 76,49% загальна кількість нафтових вуглеводнів через 30 днів, про що свідчать аналізи GC-FID та GC MS. Алкани з коротким ланцюгом та специфічні ароматичні сполуки були повністю розкладені протягом 6 днів.

Секвенування ген 16S рРНК показав, що вихідне бактеріальне співтовариство в основному складалося з *Marinobacter* та понад 30 недомінантних родів мікроорганізмів. Але у період найвищої деградації нафти бактерії роду *Alcanivorax* стали домінуючими у спільноті (Uribe-Flores MM, Cerqueda-García D та ін. 2019).

## РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

Нафтопродукти є одними з найбільш поширених і токсичних речовин, на територіях, порушених внаслідок антропогенної діяльності. Загроза забруднення навколишнього середовища сировою нафтою і продуктами її переробки стоїть гостро не тільки для нафтовидобувних і нафтопереробних регіонів. Будь-яка територія може зіткнутися з подібним забрудненням, оскільки зберігання і транспортування паливно-мастильних матеріалів, розливи нафти та нафтопродуктів внаслідок аварійних ситуацій поширені повсюдно (Li P, Cai Q, Lin W, Chen B, Zhang B, 2016).

Область поширення нафти та нафтопродуктів не обмежується тільки тими ділянками, на яких здійснюється безпосереднє використання нафти та нафтопродуктів. Навіть в районах, вільних від господарської діяльності людини, вуглеводні можуть транспортуватися з повітряними та водними потоками та забруднювати території.

Отже, забруднення нафтою – це екокатастрофа. Паливно-мастильні матеріали, потрапляючи у воду або ґрунт, порушують процеси життєдіяльності. Пригнічують мікробне самоочищення, змінюють напрям метаболізму.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Розробив		Філь І.А.			РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Воронцов О.О.					20	92
Рецензент						Кафедра БТМ <sup>20</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						



*Рис.2.1.* Розлив нафти в Чорному морі

В даний час у світі виробляється або використовується для ліквідації розливів нафти більше двох сотень різних сорбентів, які поділяють на неорганічні, природні органічні та органомінеральні, а також синтетичні.

1. Неорганічні сорбенти. Глина, діатомітові породи (головним чином рихлий діатоміт ківельгур), пісок, цеоліти, туфи пемзи тощо.
2. Синтетичні сорбенти. Виготовляють з поліпропіленових волокон, що формуються в неткані рулонні матеріали різної товщини.
3. Природні сорбенти. Деревна тріска та тирсу, модифікований торф, шерсть, макулатуру, вовна.

Загальним недоліком вищеназваних сорбентів є необхідність їх подальшого збору, який дуже трудомісткий, вимагає спеціальних засобів і практично неможливий при значному хвилюванні водної поверхні.

Отже, існує необхідність у пошуку методів очистки нафтових розливів, що не потребують подальшого збору та утилізації. Таким методом може бути використання біопрепаратів - препаратів на основі штамів мікроорганізмів. Приклади таких препаратів наведені в *таблиці 2.1*.

**Біопрепарати для очистки води від нафти та нафтопродуктів**

Назва препарату	Діюча речовина	Норми витрати	Термін очищення	Ціна	Країна виробник
1	2	3	4	5	6
Еконадін	<i>P. fluorescens</i> разом із торфом	0,25 кг/кг	2-4 тижні з поверхні води	48 грн/кг	Україна
PARA-BAC	Полібактеріальний	100 кг/400-600 кг	2-4 тижні з поверхні води	\$16 /кг	США
М-1000*Х	Полібактеріальний	100 кг/400-600 кг	2-4 тижні з поверхні води	\$14/кг	США
Еколан-М	Полібактеріальний	100 кг/400-800 кг	2-4 тижні з поверхні води	200 грн/кг	Україна

**2.1 Потреби у цільовому продукті**

Один з найбільших нафтових розливів у Чорному морі стався у 2021 році. Аварія сталася 7 серпня на морському терміналі Каспійського трубопровідного консорціуму (КТК) під час закачування нафти на грецький танкер "Мінерва Симфоні".

За оцінками Всесвітнього фонду дикої природи (WWF), в акваторію вилилося щонайменше 100 тонн (100 000 кг) нафти, а загальна площа забрудненої території сягає близько 80 квадратних кілометрів.

Неподалік Феодосії був зафіксований розлив нафти. За даними космічного моніторингу, 21 січня 2020 року в Чорному морі біля берегів півострова Крим був виявлений слід суднового скидання нафтопродуктів площею 86,1 км<sup>2</sup> і протяжністю 55,1 км. За попередніми оцінками кількість нафти, що потрапила до акваторії становить близько 90 тонн (90 000 кг).

Це одні з найбільших розливів нафти в Чорному морі за останні роки. На прикладі цих випадків ми можемо зрозуміти потреби у виробництві біопрепаратів для очистки води та попередження екологічних катастроф.

Враховуючи те що розливи нафти у морських акваторіях є непрогнозованими, існує необхідність у створенні запасу біопрепарату.

В препараті Еконадін, який ми розглядаємо як приклад норми витрати складають 0,25 кг препарату на 1 кг забруднюючої речовини. Концентрація біомаси у біопрепараті Еконадін складає 0,75 % від загальної маси. Наш препарат розрахований до використання у сухій формі задля збільшення терміну зберігання, тобто препарат буде складатися з біомаси. Витрати препарату показано в *таблиці 2.2*.

*Таблиця 2.2*

#### Витрати препарату

Розлив	Кількість нафти, що розлилася, кг	Кількість сухого препарату для обробки, кг	Кількість біомаси, кг
07.08.2021	100 000	0,00075	75
21.01.2020	90 000		67,5
<b>Разом</b>	190 000		<b>142,5</b>

Отже, загальна кількість біомаси *P. aeruginosa* NCIM 551 для приготування препарату для очистки води від нафти та нафтопродуктів складає 142,5 кг.

## 2.2 Обґрунтування вибору біологічного агенту

У якості потенційних продуцентів біомаси для створення біопрепарату для очищення морських акваторій від нафти та нафтопродуктів розглянемо такі штами: *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514, *Pseudomonas sp.* WD23, *Pseudomonas fluorescens* PMMD3.

Таблиця 2.3

## Порівняльна характеристика продуцентів

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Біодеградація, %	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
1	2	3	4	5	6	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 5514	Сира нафта – 0,03 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 40 FeCl <sub>3</sub> – 0,05 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O – 1 CaCl <sub>2</sub> – 0,02 MgSO <sub>4</sub> – 0,2	120	5	100	t° = 37°C; pH 7,0 n = 180 об/хв	Varjani SJ, Upasani VN. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 5514. <i>Bioresour Technol.</i> 2016 Dec;222:195-201.
<i>Pseudomonas sp.</i> WD23	Сира нафта – 0,01 MgSO <sub>4</sub> – 0,2 CaCl <sub>2</sub> – 0,02 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O – 1 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 1 FeCl <sub>3</sub> – 0,05	360	0,02	95	t° = 37°C; pH 7,2 n = 120 об/хв	Goveas LC, Selvaraj R, Vinayagam R, Alsaiani AA, Alharthi NS, Sajankila SP. Nitrogen dependence of rhamnolipid mediated degradation of petroleum crude oil by indigenous <i>Pseudomonas sp.</i> WD23 in seawater. <i>Chemosphere.</i> 2022 Oct;304:135235.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PMMD3	Сира нафта – 0,01 NaCl – 10 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,5 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 3 FeCl <sub>3</sub> – 0,01 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O – 1,5 CaCl <sub>2</sub> – 0,01 MgSO <sub>4</sub> – 0,1	960	0,81	93	t° = 37°C; pH 7,0 n = 150 об/хв	Sakthipriya N, Doble M, Sangwai JS. Systematic investigations on the biodegradation and viscosity reduction of long chain hydrocarbons using <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> . <i>Environ Sci Process Impacts.</i> 2016 Mar;18(3):386-97.

Проаналізувавши данні види мікроорганізмів можна зробити висновок, що *P. aeruginosa* NCIM 5514 є кращим у використанні за інші штами бактерій оскільки він продукує найбільше біомаси за інші мікроорганізми та має найбільший відсоток біодеградації – 100%.

Для точного порівняння собівартості середовищ культивування мікроорганізмів зіставляється таблиця вартості компонентів середовища в розрахунку на 1 літр рідкого середовищ (табл.1.3)

Таблиця 2.4

### Порівняння вартості поживних середовищ для одержання цільового продукту

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента на 1 л середовища	Джерело інформації
1	2	3	4	5
<i>P. aeruginosa</i> NCIM 551	Сира нафта – 0,03	19,4	0,000582	[1]
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1	52	0,052	[2]
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 4	58	0,232	[3]
	FeCl <sub>3</sub> – 0,05	50	0,0025	[4]
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O – 1	132	0,132	[5]
	CaCl <sub>2</sub> – 0,02	40	0,0008	[6]
	MgSO <sub>4</sub> – 0,2	93	0,0186	[7]
<b>Вартість 1 л середовища – 0,44 грн</b>				
<i>P. sp.</i> WD23	Сира нафта – 0,01	19,4	0,000194	[1]
	MgSO <sub>4</sub> - 0,2	93	0,0186	[7]
	CaCl <sub>2</sub> – 0,02	40	0,0008	[6]
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O - 1	132	0,132	[5]
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 1	52	0,052	[2]
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> - 1	58	0,058	[3]
	FeCl <sub>3</sub> – 0,05	50	0,0025	[4]
<b>Вартість 1 л середовища – 0,27</b>				
<i>P. fluorescens</i> <i>PMMD3</i>	Сира нафта – 0,01	19,4	0,000194	[1]
	NaCl – 10	12	0,12	[8]
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 1,5	52	0,078	[2]
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> – 3	58	0,174	[3]
	FeCl <sub>3</sub> – 0,01	50	0,0005	[4]
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O – 1,5	132	0,198	[5]
	CaCl <sub>2</sub> – 0,01	40	0,0004	[6]
	MgSO <sub>4</sub> – 0,1	93	0,0093	[7]
<b>Вартість 1 л середовища – 0,6</b>				

**Примітка.** \* – Ціни наведено станом на грудень 2022 року.

1. <https://index.minfin.com.ua/ua/markets/oil/>
2. <https://prom.ua/>
3. <https://klebrig.com.ua/ua/>
4. <https://ukrchemgroup.com.ua/p933618352-hlorid-zheleza-iii.html>
5. [https://chemtest.com.ua/ua/kalij\\_fosfornokislij\\_2-zast](https://chemtest.com.ua/ua/kalij_fosfornokislij_2-zast)
6. <https://rozetka.com.ua/ua/>
7. [https://klebrig.com.ua/ua/p1323818049-sulfat-magniia-klebrig.html?source=merchant\\_center&utm\\_source=google&utm\\_medium=cp&utm\\_campaign=Perf\\_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw69moBhBgEiwAUFCx2AUsz4yJ\\_QftYskV3NOVu3lyOeJ9xU7h7UsosLxZ3Ocg2GdB5NQIHRoC0mMQAvD\\_BwE](https://klebrig.com.ua/ua/p1323818049-sulfat-magniia-klebrig.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cp&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAjw69moBhBgEiwAUFCx2AUsz4yJ_QftYskV3NOVu3lyOeJ9xU7h7UsosLxZ3Ocg2GdB5NQIHRoC0mMQAvD_BwE)
8. <https://prom.ua/ua/p1710101466-nacl-sol.html?&primelead=MC45MDk5OTk5Nw>

Таблиця 2.5

### Співвідношення вартості поживних середовищ , виходу продукту та умовної вартості

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>P. aeruginosa</i> NCIM 551	5	120	0,04	0,44	0,088
<i>P. sp. WD23</i>	0,02	360	0,00005	0,27	13,5
<i>P. luorescens</i> <i>PMMD3</i>	0,81	960	0,0008	0,6	0,74

Отже, порівнявши штами продуцента можна зробити висновок, що використання *P. aeruginosa* NCIM 551 є найбільш економічно вигідним, оскільки він має найвигідніше співвідношення вартість поживного середовища/вартість кількості цільового продукту, та найбільший вихід біомаси.

### 2.3 Розрахунок річної потужності виробництва

Кількість культуральної рідини, необхідної для отримання 142,5 кг біомаси становить:

$$5 \text{ г/л біомаси } P. \text{ aeruginosa NCIM 551} - 1 \text{ л}$$

$$142\,500 \text{ г} - X \text{ л}$$

$$X = 28\,500 \text{ л культуральної рідини}$$

Розрахуємо, скільки культуральної рідини потрібно отримати за цикл ферментації, аби розрахувати кількість стадій приготування посівного матеріалу.

Даний препарат на основі висушеної біомаси мікроорганізмів може зберігатися при різній температурі ( $-25^{\circ}\text{C}$  -  $+50^{\circ}\text{C}$ ) до 5 років. Тому 95 кг біомаси ми маємо отримати за 300 днів. Враховуючи цикл роботи ферментера ( $T_{\text{цф}}$ ), який становить 126 год (мийка та огляд – 1,5 год, перевірка на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізація – 1,5 год, охолодження ферментера – 0,5 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год та ферментація – 120 год), необхідну потужність підприємства ( $G = 95$  кг) та кількість трудоднів ( $T_{\text{д}} = 300$ ), то кількість продукту на добу, л/добу:

$$V_{\text{д}} = G / T_{\text{д}} = 28\,500 / 300 = 95$$

Кількість продукту за цикл ( $V_{\text{крц}}$ ) становитиме:

$$V_{\text{крц}} = V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 95 \times 126 / 24 = 498,8 \text{ л/цикл}$$

Кількість ферментацій (циклів) на 300 днів:

$$N_{\text{цк}} = \frac{G}{V_{\text{крц}}} = \frac{28\,500}{498,8} = 58$$

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні  $E_{св}$  (що складають при виділенні біомаси з культуральної рідини 3% + сушіння – 3% + фасування – 1%):

$$V_{кр} = K_1 \times V_{крп} \times CP_{гп} / (1 - E_{св}) = 1,1 \times 498,8 \times 0,92 / (1 - 0,07) = 543 \text{ л,}$$

де  $K_1$  – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій,  $CP_{гп}$  – масова частка сухих речовин в готовому продукті.

Геометричний об'єм ферментера для отримання 543 л культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_r = V_{крп} / K_{зап} = 543 / 0,6 = 905 \text{ л,}$$

де  $K_{зап}$  – коефіцієнт заповнення ферментера.

Підбираємо найближчий за геометричним об'ємом ферментер  $V_{ф} = 1\ 000$  л. Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{крп} / V_{ф} = 543 / 1\ 000 = 0,54, \text{ що не перевищує задане значення.}$$

За виробничий цикл отримують  $V_{крп} = 543$  л культуральної рідини. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%)) становитиме:

$$V_{роб.1} = V_{крп} / (1 - E_{ф}) = 543 / (1 - 0,1) = 603,3 \text{ л,}$$

де  $E_{ф}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом  $V_{роб.1} = 603,3$  л. При вибраному коефіцієнті заповнення  $K_{зап} = 0,6$  можливий геометричний об'єм ферментера  $V_{ф.1} = 603,3 / 0,6 = 1005,5$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 1\ 000$  л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = V_{роб.1} / V_{сф} = 603,3 / 1\ 000 = 0,59.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментеру вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{пс1} = V_{роб.1} / (1 + X_{ф}) = 603,3 / (1 + 0,1) = 495,6 \text{ л,}$$

де  $X_{ф}$  – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{пм1} = V_{роб.1} - V_{пс1} = 603,3 - 495,6 = 107,7 \text{ л.}$$

Для одержання 107,7 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{роб.2} = V_{пм1} / (1 - E_{па}) = 107,7 / (1 - 0,1) = 119,6 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{ін.} = 119,6 / 0,6 = 199,3 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{сф} = 200 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап.1} = V_{роб.2} / V_{сф} = 119,6 / 200 = 0,6.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{пс2} = V_{роб.2} / (1 + X_{ін}) = 119,6 / (1 + 0,1) = 108,7 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{пм2} = V_{роб.2} - V_{пс2} = 119,6 - 108,7 = 10,9 \text{ л.}$$

Для одержання 10,9 л посівного матеріалу кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед культивуванням в інокуляторі (з

урахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря) становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} / (1 - E_{\text{па}}) = 10,9 / (1 - 0,1) = 12,1 \text{ л}$$

Можливий геометричний об'єм інокулятора  $V_{\text{ін}} = 12,1 / 0,6 = 20,2 \text{ л}$ .  
Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{сф}} = 20 \text{ л}$  та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.3}} / V_{\text{сін}} = 12,1 / 20 = 0,6.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах.

Кількість поживного середовища в інокуляторі становитиме:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.3}} / (1 + X_{\text{ін}}) = 12,1 / (1 + 0,1) = 11 \text{ л}$$

Тоді кількість посівного матеріалу для інокулятора становить:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} - V_{\text{пс3}} = 12,1 - 11 = 1,1 \text{ л}.$$

Для одержання 1,1 л посівного матеріалу використовують качалочні колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення  $K_{\text{зк}} = 0,2$ . Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}} = 1100 / 750 \times 0,2 \approx 8 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 3 качалочні колби.

Отже, одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 1 000 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у такі етапи:

**1 етап.** Вирощування посівного матеріалу в 8-ми колбах на качалках.

**2 етап.** Вирощування посівного матеріалу в малому інокуляторі об'ємом 20 л.

**3 етап.** Вирощування посівного матеріалу в середньому інокуляторі об'ємом 200 л.

**5 етап.** Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 1 000 л.

## **2.4 Обґрунтування вибору товарної форми випуску цільового продукту**

### **2.4.1. Обґрунтування форми випуску препарату**

Біопрепарати на основі біомаси мікроорганізмів можуть бути представленні у рідкій та сухій формах.

Суха форма випуску біопрепарату має ряд переваг у порівнянні із рідкою, наприклад:

- Довший термін придатності. Суха форма біопрепарату має довший термін придатності порівняно з рідкими формами, що дозволяє зберігати біопрепарат для подальшого використання без зниження його ефективності.
- Зручність транспортування і зберігання. Сухий біопрепарат менше займає місця при транспортуванні та зберіганні порівняно з рідкими формами. Це може значно спростити логістику та зменшити витрати на зберігання.
- Мінімізація ризику розливу. Під час транспортування та обробки рідких біопрепаратів існує ризик розливу. Сухий біопрепарат не містить рідини, тому ризик забруднення навколишнього середовища через витікання зменшується.
- Легкість дозування. Сухий біопрепарат може бути легше і точніше дозований під час застосування, що сприяє оптимальному використанню препарату та мінімізації втрат.
- Збільшення стабільності. Сухі біопрепарати більш стійкі до несприятливих умов зберігання, таких як температурні коливання. Це

важливо для забезпечення ефективності біопрепарату протягом тривалого періоду зберігання.

Отже, зупиняємо на вибір саме на сухій формі біопрепарату через ряд об'єктивних переваг, таких як збільшений термін зберігання, зручність транспортування та дозування, а також стабільність препарату.

#### **2.4.2. Обґрунтування вибору упаковки**

Основними параметрами для вибору типу упаковки є

- Стійкість до вологи та впливу зовнішнього середовища;
- Зручність зберігання та транспортування;
- Вартість;
- Екологічність.

Фасування біопрепарату буде здійснюватися по 50 кг. Приклади упаковки для такого об'єму:

- Пластиковий контейнер. Перевагами такого типу упаковки є те, що вони мають герметичні кришки, які забезпечують захист від вологи та зовнішнього середовища. Недоліками є відсутність економії місця при зберіганні та транспортуванні, досить велика вага упаковки та висока вартість.
- Паперова упаковка. Перевагами є те, що така упаковка може бути легко утилізована та досить легка. Проте папір вразливий до вологи, та механічного впливу.
- Поліпропіленові мішки з поліетиленовим вкладишем. Даний тип упаковки є стійким до надлишку вологи, має перевагу в найменших розмірах, що сприяє економії простору та легкому транспортуванню, має малу власну вагу та низьку вартість.
- Металеві контейнери. Металеві бідони або бочки можуть бути використані в умовах коли потрібен особливо міцний та стійкий до

впливу навколишнього середовища контейнер, але велика вага та вартість робить цей тип упаковки недоцільним.

Отже, проаналізувавши запропоновані варіанти упаковки, було зроблено висновок, що поліпропіленові мішки з поліетиленовим вкладишем є найоптимальнішим варіантом через значні переваги такого типу пакування за основними параметрами.

### РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ

Цільовим продуктом виробництва, що проектується є біомаса *P. aeruginosa* NCIM 551, яка складає основу біопрепарату, що застосовується для очищення морської акваторії від нафти та нафтопродуктів.

Першим етапом процесу виділення є відокремлення біомаси продуцента від культуральної рідини. Для цього ми обираємо один із методів, що застосовуються у біотехнології.

Другий етап – додавання до відокремленої біомаси біологічних носіїв, % від маси:

- торф – 69,9;
- подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм) – 10;
- пісок морський – 10;
- подрібнені водорості – 10.

Які ретельно перемішують до вмісту бактерій у перерахунку на бактеріальні клітини не менше  $10^9$  в 1 г носія. Використовують стулки мідій *Mytilus galloprovincialis*, водорості: *Ceramium rubrum*, *Ulva rigida*, *Bryopsis plumosa*, *Cystoseira barbata*, *Enteromorpha intestinalis* та ін. (UA 95859).

Наступним етапом є висушування отриманої суміші з метою збільшення терміну зберігання препарату.

Після висушування препарату йде процес подрібнення та просіювання частинок певного розміру.

Останнім етапом є фасування, пакування та маркування. Сучасні технології дозволяють здійснювати це автоматизовано.

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ	Лім.	Арк.	Акрушів
Розробив	Філь І.А.						34	92
Керівник	Воронцов О.О.					Кафедра БТМ <sup>34</sup>		
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Отже, технологія отримання (виділення) біомаси *P. aeruginosa* NCIM 551 буде складатися з наступних стадій:

1. відокремлення біомаси від культуральної рідини після біосинтезу;
2. змішування біомаси із носіями;
3. висушування маси;
4. подрібнення;
5. просіювання;
6. фасування, пакування та маркування.

### 3.1 Обґрунтування способу відокремлення біомаси

Основними компонентами культуральної рідини після закінчення біосинтезу є залишки поживного середовища та біомаса продуцента. Для відокремлення біомаси від культуральної рідини в біотехнології застосовуються наступні методи:

- сепарування;
- фільтрація;
- седиментація;
- флоатація;
- центрифугування.

Вибір способу та обладнання залежить від особливостей продуцента, властивостей культуральної рідини та масштабу виробництва.

**Сепарація або відділення** - процес розділення сумішей, які включають різні частки твердих матеріалів, рідин різної щільності, або емульсії та суспензії твердих часток або крапельок у газі або парі. У цьому процесі компоненти, які розділяються, залишають свій хімічний склад незмінним.

Сепарація ґрунтується на відмінностях у фізичних або фізико-хімічних властивостях компонентів суміші, таких як розміри твердих часток, форма, колір, блиск, коефіцієнт тертя, міцність, пружність, змочуваність поверхні,

магнітна сприйнятливість, електропровідність, люмінесценція, радіоактивність і інші.

Сепарація має кілька переваг порівняно з іншими методами:

- Відсутність необхідності у застосуванні фільтрувальних елементів, що дозволяє використовувати непотрібну фракцію як кормову добавку для подальшої переробки.
- Обробка матеріалу з найменшими витратами активної речовини.
- Процес легко автоматизується, обладнання займає менше місця і легше миється.

Недоліками сепараторів є швидке забруднення мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями й клітинами дріжджів, що робить застосування цього методу розділення недоцільним для деяких виробничих процесів.

**Фільтрація.** Фільтраційні системи, такі як барабанні, стрічкові, фільтр-преси та мембранні фільтри, спираються на загальний принцип затримки частинок за допомогою пористої фільтруючої перегородки. Ці системи можуть бути класифіковані як періодичної або безперервної дії, працювати під вакуумом чи при надлишковому тиску. Фільтри безперервної дії автоматично подають суспензію та відводять фільтрат, тоді як фільтри періодичної дії вимагають втручання та ручного відвантаження фільтрату.

Цей метод має свої переваги, такі як простота використання, невеликі капітальні та експлуатаційні витрати та можливість автоматизації. Однак його недоліки включають налипання фільтруючої речовини на фільтри та забивання пор колоїдними частинками, що призводить до зменшення швидкості фільтрування, збільшення енерговитрат та необхідність ручного відвантаження осаду та заміни фільтруючих елементів при періодичному використанні.

**Седиментація** - це процес осідання часток під впливом сили тяжіння. Стійкість седиментації тісно пов'язана з осіданням частинок, яке зумовлене виключно їхнім розміром. Седиментацію застосовують для відділення конгломератів, таких як "кефірні зерна", у деяких процесах молочнокислого чи змішаного бродіння, а також під час біологічної обробки відходів активним мулом.

Недоліком цього методу є тривалість технологічної операції.

**Флотація** представляє собою метод адсорбційно-бульбашкового поділу, що базується на утворенні спливаючих агломератів забруднень у диспергованій газовій фазі та їх наступному відділенні у верхніх шарах. Основні переваги цього процесу включають:

- безперервність процесу;
- широкий діапазон застосування;
- невеликі капітальні і експлуатаційні витрати;
- простота використання;
- висока швидкість процесу.

Недолік цього методу полягає у важкому видаленні тонких дисперсних частинок, розмір яких менше 5-10 мкм. Ці частинки погано флотуються, що ускладнює їх вилучення і впливає на ефективність виділення більших частинок.

**Центрифугування** використовується для примусового осадження часток шляхом збільшення швидкості відцентрових сил. У мікробіологічній галузі ця техніка широко застосовується для розділення суспензій на рідинну і тверду фази, які включають в себе мікроорганізми, ферменти, амінокислоти та інші продукти біосинтезу з кристалічною або аморфною структурою.

У технологіях мікробного синтезу використовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервної дії і т.д. Центрифугування дозволяє видокремлювати біомасу бактерій, дріжджів і міцеліальних грибів з культуральних рідин.

Отже, після аналізу методів відокремлення біомаси, вказаних вище, можна зробити висновок, що центрифугування є найбільш доцільним методом.

**Вибір центрифуги.** Вибір обладнання для центрифугування здійснюється на основі особливостей клітин продуцента та технологічного процесу.

Розрізняють такі основні типи центрифуг:

- стандартні центрифуги можуть бути відстійними і фільтруючими;
- надцентрифуги є апаратами тільки відстійного типу і поділяються на трубчасті надцентрифуги, які використовуються для розділення тонкодисперсних суспензій, і рідинні сепаратори, які використовуються для розділення емульсій.

У стандартних центрифуг число обертів не перевищує 10 000 об/хв, в свою чергу у надцентрифуг це число перевищує 100 000 об/хв.

Залежно від організації процесу центрифуги бувають періодичної дії і безперервної дії.

Якщо розділяти центрифуги за призначенням, то можна виділити фільтруючі і осаджуючі центрифуги.

Центрифуги з фільтруючими барабанами зазвичай використовують барабани, внутрішня поверхня яких покрита тканиною або іншою

фільтруючою перегородкою. Цей вид центрифуг використовується для відділення суспензій, що містять зернисту або тверду кристалічну фазу.

Центрифуги з осаджувальними барабанами також мають однорідний барабан. Цей тип центрифуг частіше за все використовується для розділення середньо- і дрібнозернистих суспензій, які важко піддаються фільтрації. Це особливо актуально, коли в отриманому осаді може бути високий вміст рідкої фази, і використання фільтруючих поверхонь є неможливим.

Враховуючи розмір клітин ( $0,5-0,7 \times 1-3$  мкм) найкращим вибором для відділення біомаси буде осаджувальна центрифуга.

Отже, враховуючи об'ємну концентрації культуральної рідини, потрібний ступінь відділення ми вибираємо осаджувальну центрифугу ОГШ-352К-04 (рис 3.1).



*Рис. 3.1* Осаджувальна центрифуга ОГШ-352К-04

Осаджувальна центрифуга ОГШ-352К-04 широко використовується у хімічній, харчовій та біотехнологічній сферах. Має частоту обертання 10 000 об/хв., потужність 22 кВт та робочий об'єм 1 000 л.

### 3.2 Обґрунтування способу сушіння

Сушіння є процесом видалення рідини, зазвичай води, з твердих або пастоподібних матеріалів, а також з суспензій, емульсій та розчинів. На сучасному етапі розвитку мікробіології застосовуються різні типи сушарок, такі як розпилювальні сушарки з дисковим і форсунковим розпиленням, вакуумні сушарки, вальцові сушарки та стрічкові.

Вибір методів сушіння та конструкції сушарок визначається особливостями режимів сушки для конкретного матеріалу. Мета полягає в забезпеченні високої якості сухого продукту при мінімальних капіталовкладеннях і енерговитратах. Це особливо важливо для продуктів мікробного синтезу, де оптимальні режими і методи сушіння визначаються після дослідження фізико-хімічних і теплофізичних характеристик, а також біологічних властивостей.

**Розпилюючі сушарки.** У мікробіологічної промисловості в основному використовуються розпилювальні сушарки з дисковим розпиленням.

Для обробки рідких матеріалів, які піддаються сушінню, таких як розчини солей, суспензії та емульсії, застосовують розпилюючі сушарки. В цих сушарках повітря або димові гази направляються в сушильну камеру, куди подається матеріал для сушіння. Така конфігурація створює велику поверхню випаровування матеріалу і забезпечує ефективний тепловий контакт, що дозволяє проводити сушіння швидко. Час сушіння зазвичай складає 15-30 секунд. Навіть при високих температурах теплоносія розкладання продукту в розпилюючих сушарках не відбувається, результатом чого є отримання високоякісного тонкоподрібненого продукту.

Такі сушарки мають свої недоліки, серед яких великі розміри сушильної камери через повільний рух сушильного агента та невисокий тиск в камері для випаровування вологи (від 2 до 25 кг/(м<sup>3</sup>год)). Також важкість механізмів розпилення, системи пиловловлювача і вивантаження додає

складнощів. Використання цих сушарок може бути непрактичним через їхню низьку продуктивність.

**Вакуумні сушарки.** Сушарка працює в періодичному режимі і являє собою шафу циліндричної форми та закривається герметично.

Вакуумні сушарки мають численні переваги, зокрема можливість сушіння матеріалів при низьких температурах, менша витрата тепла, можливість уловлювання парі цінних компонентів, таких як спирти та органічні рідини, а також забезпечення кращих санітарних та безпечних умов для обслуговуючого персоналу.

З іншого боку, вони мають свої недоліки, такі як обмежена продуктивність, необхідність вручну виконувати деякі операції, більше часу, витраченого на сушіння, а також процес завантаження та вивантаження матеріалу, що може робити їх використання менш ефективним та нецільовим.

**Вальцьові сушарки.** Вальцеві сушарки зазвичай використовують для сушіння тістоподібних рідких суспензій, які не можуть переносити тривалий період сушіння. Механізм сушіння реалізується на зовнішній поверхні порожнистих обертових барабанів. Ці сушарки працюють безперервно, і вони не вимагають ручного завантаження. Однак їх конструкція підходить лише для сушіння пастоподібних продуктів, тому використання цього типу сушарок в інших випадках виключено.

**Стрічкові сушарки.** Основним компонентом стрічкової сушарки є безкінечна горизонтальна стрічка, яка переміщується всередині камери. Сировина надходить з одного кінця стрічки і викидається з іншого кінця. Коли вона досягає кінця стрічки, вона розподіляється на стрічку, що розташована нижче, і починає рухатися в протилежному напрямі. Цей процес повторюється кілька разів, поки матеріал не виходить через вихідний отвір. Стрічкові багатоярусні сушарки ідеально підходять для висушування різних

сипучих і кристалічних продуктів, не потребують ручного завантаження або вивантаження і є досить компактними.

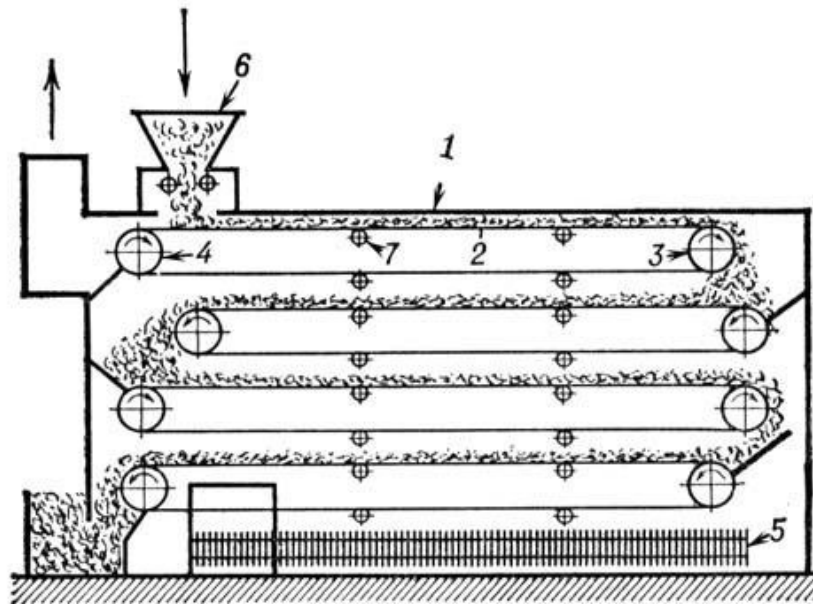


Рис. 3.2 Багатоярусна стрічкова сушарка

Дані сушарки можна застосовувати як для великих, так і для малих обсягів продукції. Прості в експлуатації.

З наведених вище даних можна зробити висновок, що доцільніше застосовувати стрічкову сушарку, оскільки цьому типу сушарок притаманна:

- висока продуктивність;
- компактність;
- не вимагають ручної праці на завантаження і вивантаження продукту;
- вони добре підходять для висушування термостабільних продуктів;
- можна використовувати для багатотоннажних виробництв.

Обираємо багатоярусну стрічкову сушарку “Perry” (Рис. 3.3)



*Рис. 3.3* Багатошарова стрічкова сушарка “Perry”

### **3.3 Обґрунтування вибору стадій отримання товарної форми**

Після сушки препарату у стрічковій сушарці треба подрібнити та просіяти просіяти майбутній препарат для подальшої реалізації.

Для цього будемо використовувати барабанний млин ТМ 500 XL (*рис. 3.4*) – процес подрібнення може проводитися як в сухому, так і в мокрому вигляді. За допомогою відповідних модулів барабанна млин ТМ 500 XL може використовуватися або як кульова, або як стрижнева. Для ефективного подрібнення потрібна достатня кількість куль або стрижнів. Зазвичай досягається тонкість менше 20 мкм. Робочий об’єм до 150 л.



*Рис. 3.4* Барабанний млин ТМ 500 XL

Обираємо просіваюльну машину ПТ-3000 (рис. 3.5) має такі переваги:

- короткий час просіювання;
- точність аналізу і зручність в роботі;
- відповідність вимогам стандарту ISO 9001;
- простота експлуатації;
- ергономічний дизайн;
- не потребує технічного обслуговування.

Максимальна кількість продукту для просіювання: 100 кг. Діапазон вимірювань: 25 мкм-125 мм.



*Рис. 3.5* Просіваюльна машина ПТ-3000

Після сушіння, подрібнення та просіювання необхідно упакувати сухий препарат у поліпропіленові мішки з поліетиленовими вкладишами. Фасовка порошків здійснюється за допомогою спеціальних фасувальних апаратів. Фасування препарату буде здійснюватися по 50 кг. Обираємо фасувальну машину виробництва НВП «Техноваги», що використовується для фасування сипучих продуктів (борошно, комбікорм, крохмаль, зернові продукти тощо) у відкриті мішки до 50 кг. (рис. 3.6).



*Рис. 3.6* Фасувальна машина

Для зшивання мішків із готовим продуктом будемо використовувати стенд для зашивання мішків GK-S8 та машинку GK 35-2C виробництва ТОВ "Віал Плюс" (рис. 3.7). Стенд для зашивання мішків GK призначений для зашивання поліпропіленових, джутових і паперових мішків. Цей мішкозашивальний стенд оснащений машиною GK 35. Мішкозашивальна машина міцно кріпиться до стенду, що дозволяє зручно регулювати висоту за потребою. Наявність вбудованих рухливих ножів на мішкозашивальній машині дозволяє здійснювати напівавтоматичну або ручну обрізку нитки.



*Рис. 3.7.* Стенд для зашивання мішків GK-S8 та машинку GK 35-2C

## РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНО ОБЛАДНАННЯ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯМ

Підбір технологічного обладнання представлений в таблиці 4.1.

*Вихідні дані:*

- Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації –  $V_{кр} = 533$  л;
- Концентрація біомаси у КР = 5 г/л;
- Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають 7%;
- Початкова кількість цільового продукту, яка поступає з КР складає  $533 \text{ л} \times 5 \frac{\text{г}}{\text{л}} = 2\,665$  г;
- Кінцева кількість (з урахуванням 7% втрат) має становити  $2\,665 + 7\% = 2\,851,6$  г.

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у таблиці:

*Таблиця 4.1.*

**Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям**

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (разом 7%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 1. Відділення біомаси</b>						
1	ТП 1.1 Центрифугування.	Біомаса <i>P. aeruginosa</i> NCIM 551	2 851,6 г	3%	2 766,1 г	Осаджувальна центрифуга Мішалка: 10 000 об/хв.
<b>ТП 2. Отримання напівфабрикату</b>						
2	ТП 2.1. Змішування біомаси із біологічними носіями	Суміш препарату (вологість 60%)	2 766,1 г + 1 933 503,9 г + (276 610 г × 3)	–	2 766 100 г ≈ 2 766,1 кг	Шнековий змішувач Швидкість обертання 75-80 об/хв.

НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНО ОБЛАДНАННЯ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯМ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив	Філь І.А.							46
Керівник	Воронцов О.О.					<b>Кафедра БТМ<sup>46</sup></b>		
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

## Закінчення таблиці 4.1.

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (разом 7%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 3. Сушіння біомаси</b>						
3	ТП 3.1. Сушіння суміші	Висушена суміш (вологість 20%)	2 766,1 кг	3%	1 576,7 кг	Одношарова стрічкова сушарка Температура 60 °С.
<b>ТП 4 Подрібнення та просіювання</b>						
4	ТП. 4.1. Подрібнення	Подрібнений препарат у вигляді порошку (вологість 20%)	1 576,7 кг	–	1 576,7 кг	Барабанний млин Ступінь подрібнення: 2 мм.
5	ТП. 4.2. Просіювання	Просіяна маса (вологість 20%)	1 576,7 кг	–	1 576,7 кг	Просіювальна машина Ступінь просіювання: 2 мм.
<b>ПМВ 4. Фасування, пакування та маркування</b>						
6	ПМВ 5.1. Фасування готового препарату	Поліпропіленові мішки з готовим препаратом по 50 кг	1 576,7 кг	1%	1 560,9 кг ≈ 32 мішки	Фасувально-пакувальна вертикальна машина Діапазон зважувань: 50 кг.
7	ПМВ 5.2. Маркування	Поліпропіленові мішки з готовим препаратом по 50 кг	32 мішки		32 мішки	Стенд для зашивання мішків
8	ПМВ 5.3. Пакування на піддони	Дерев'яні піддони із мішками з готовим препаратом	32 мішки		32 мішки ≈ 4 піддони	Дерев'яні піддони

## РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1

### Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Н-1 Н-3	Відцентровий насос	2	Герметичний відцентровий насос з магнітною муфтою DM 10 з поліпропілену або фторопласта. Продуктивність 35 л/хв, температурні параметри середовища, що перекачується від +3 до +95 °С. Виробник: «ДЕВЕМ», Італія
Р-2	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Збірник для об'ємом 1 000 л перемішувальним пристроєм (10-450 об/хв) з рубашкою. Матеріал – Нержавіюча сталь sus316L Виробник: «Промфарм НПК», Україна
Ц-4	Центрифуга	1	Осаджувальна центрифуга ОГШ-352К-04. Робочий об'єм: 300 л. Мішалка: 10 000 об/хв. Виробник: АТ «СМНВО» (Україна)
З-5	Змішувач	1	Шнековий змішувач ШС-1000 Робочий об'єм 3 000 л Швидкість обертання 80 об/хв. Виробник: Agro Build Group (Україна)
Д-6	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Об'ємно-ваговий дозатор універсального типу FOYER FZ-5000-II Матеріал корпусу – нержавіюча сталь Діапазон зважувань – до 100 кг Виробник «КОЗАК» (Україна)
К-7 К-9	Стрічковий конвеєр	2	Стрічковий конвеєр ЛТ-4-400 Швидкість руху стрічки – 0,58 м/с Продуктивність – 55 т/год Ширина транспортної стрічки – 1200 мм Виробник: 4BUILD (Україна)

НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив	Філь І.А.						48	92
Керівник	Воронцов О.О.					<b>Кафедра БТМ</b> <sup>48</sup>		
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Закінчення таблиці 5.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
С-8	Сушарка	1	Багатошарова стрічкова сушарка "Perry". Максимальна температура 60 °С. Виробник: Чжэцзян Цяньцзян Вэйган (Китай)
БД-10	Дробарка	1	Барабанный млин ТМ 500 XL. Ступінь подрібнення: 1-2 мм. Робочий об'єм – 300 л. Виробник: «Retsch» (Німеччина)
ПМ-11	Просіювач	1	Просіювальна машина ПТ-3000 Ступінь просіювання: 25 мкм – 125 мм. Максимальний об'єм – 300 кг. Виробник: ООО «Технік» (Україна)
ФМ-12	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувально-пакувальна для сипучих продуктів Маса дози – від 10 до 50 кг. Точність дозування – 0,5-1 %. Виробник НПП «Техноаги» (Україна)
МС-13	Мішкозашивочний стенд	1	Стенд для зашивання мішків GK-S8 + машинка Тип стібка: щільний, двунитковий Довжина стібка: 6,5-11 мм Потужність: 370 W Управління: педаль ножна, шкаф електричний Виробник ТОВ "Віал Плюс" (Україна)

- <https://promvit.com.ua/>
- [https://www.debem.com.ua/nasos/nasosy\\_s\\_magnitnoj\\_muftoj/](https://www.debem.com.ua/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/)
- <https://frunze.com.ua/produkcija-3/centrifugi/>
- <https://prom.ua/brands/4build>
- <https://prom.ua/ua/c3828604-agro-build-group.html>
- <https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines>
- <https://perryvidex.eu/category/dryers/rotary-hot-air-dryer>
- <https://www.retsch.com/products/milling/>
- <https://prom.ua/c2129066-firma-tehnik.html>
- <https://technowagy.com.ua/ru/products/fasovohnaya-mashina-dlya-sypuchih-produktov-v-otkrytye-meshkido-50-kg/>
- <https://vialplus.kiev.ua/ua/p1778593378-stend-dlya-zashivki.html>

## РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### ТП 1. Відділення біомаси

#### ТП 1.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина з ферментеру відцентровим насосом (Н-1) подається в збірник культуральної рідини об'ємом 1 000 л (Р-2). Зі збірника відцентровим насосом (Н-3) культуральна рідина подається у осаджувальну центрифугу (Ц-4), де здійснюється центрифугування при 10 000 об/хв, тривалістю 40 хв.

Отриману сконцентровану біомасу масою 2 766,1 г вивантажують вручну та подають у шнековий змішувач (З-5). Залишки фугату направляють на стадію утилізації.

### ТП 2. Отримання напівфабрикату

#### ТП 2.1. Змішування біомаси із біологічними носіями

У шнековий змішувач (З-5) додають через об'ємно-ваговий дозатор універсального типу (Д-6) наважки 1 933 503,9 г торфу, 276 610 г подрібнених ступок мідій, 276 610 г піску морського, 276 610 г подрібнених водоростей та вологу біомасу. Після чого вмикають перемішувач на відмітку 75-80 об/хв і перемішують протягом 10-15 хв (до утворення однорідності).

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив	Філь І.А.						50	92
Керівник	Воронцов О.О.							
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ <sup>50</sup>		

### **ТП 3. Сушіння суміші**

#### *ТП 3.1. Сушіння на стрічковій сушарці*

Із шнекового змішувача через вигрузний люк пересипають на конвеєрну стрічку (К-7) котра приєднана до стрічкової сушарки (С-8). Сушіння здійснюють протягом 30 хв при температурі, яка дорівнює 60 °С до вологості до 20%.

### **ТП 4. Подрібнення та просіювання**

#### *ТП 4.1. Подрібнення*

Після процесу сушіння через конвеєрну стрічку (К-9), що приєднана до цілісної системи що направляється на стадію подрібнення. Подрібнення препарату здійснюється на барабанній дробарці (БД-10) Висушений препарат (від ТП 3.1) завантажується безпосередньо в зафіксований у вертикальному положенні барабан дробарки, після чого він закривається кришкою. Подрібнення здійснюють до заданого діаметру сітки з розміром часток 2 мм, тривалість процесу становить протягом 30 хв.

#### *ТП 4.2. Просіювання*

Подрібнена маса препарату (від ТП 4.1) вивантажують через нижній відсік у просіювальну машину що містить конвеєрну подачу (ПМ-11), де проходить через ряд сит з діаметром отворів 2 мм. Просіювання здійснюється протягом 30 хв. Фракції розміром менше 2 мм йдуть на подальше пакування.

### **ПМВ 5. Фасування, пакування та маркування**

#### *ПМВ 5.1. Фасування готового препарату*

Фасування біомаси здійснюють на фасувальному автоматі (ФМ-12) у поліпропіленові мішки з поліетиленовими вкладишами по 50 кг. Подрібнений і просіяний порошок біомаси (від ТП 4.2) подається у накопичувальний бункер вагового фасувального автомату, звідки за

допомогою вагового дозатора фасується по 50 кг у поліпропіленові мішки з поліетиленовими вкладишами.

### *ПМВ 5.2. Маркування*

Маркування продукту відбувається на мішку та при зшиванні на мішкозашивочному стенді (МС-13) додається. На упаковці вказується наступна інформація: назва виробника, назва продукту, маса нетто, номер партії, дата виготовлення.

### *ПМВ 5.3. Пакування на піддони*

Пофасованні по 50 кг та промарковані мішки з готовим продуктом пакуються на дерев'яні піддони для подальшого транспортування.

## РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

### 7.1. Мікробіологічний контроль

В процесі культивування періодично відбирають проби з культуральною рідиною для мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси (яка і є цільовим продуктом) і колоній утворюючих одиниць, а також вмісту джерела вуглецю.

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюють наступними шляхами: прямим висів на агаризовані поживні середовища та мікроскопіювання.

*Прямий висів на агаризоване поживне середовище.* Прямий висів здійснюють посівом культуральної рідини та проб готового посівного матеріалу методом виснажувального штриха до ізольованих колоній на чашки Петрі. Після розсівання здійснюють інкубування. Потім проводять мікроскопіювання мікроорганізмів з окремих колоній, які вирости на чашках Петрі за допомогою світлового мікроскопу (Dean D.A., Evans E.R., Hall I.H 2000).

Для приготування препарату «роздавлена крапля» на чисте, знежирене предметне скло за допомогою піпетки наносять маленьку краплю водопровідної води. Далі за дотримання асептичних умов бактеріологічною петлею у воду вносять невелику кількість культури мікроорганізмів, які вирости на чашках Петрі, розмішують та накривають покривним скельцем.

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив	Філь І.А.						53	92
Керівник	Воронцов О.О.					Кафедра БТМ <sup>53</sup>		
Рецензент								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

При приготуванні препарату слід вносити невелику кількість мікроорганізмів та не допускати утворення бульбашок повітря під накривним склом, при надлишку води її необхідно видалити за допомогою фільтрувального паперу. Мікроскопіювання проводять за сухою системою (Пирог Т.П., Ключка Л.В. 2021).

*Мікроскопіювання.* За відсутності у зразку контамінації під час мікроскопіювання можна побачити клітини *P. Aeruginosa* NCIM 5514. Бактерії мають паличкоподібну форму із закругленими кінцями, розміри клітин  $-(0,5-0,7) \times (1-3)$  мкм, вони є рухливими, спор не утворюють, грамнегативні. У мазках розташовується поодинокі, парами чи короткими ланцюжками. При рості на м'ясо-пептонному агарі утворюють колонії – напівпрозорі молочно-білого кольору з перламутровим відтінком. Центр колонії темніший, ніж периферія, краї рівні, чіткі (Cabeen MT, Leiman SA, Losick R. 2016).



Рис.7.1. *P. aeruginosa* під мікроскопом

## 7.2 Концентрація біомаси

Непрямий метод. Концентрацію біомаси у г/л культуральної рідини визначають за допомогою фотоелектроколориметра (ФЕК), а саме за різницею оптичної густини  $D$  клітинної суспензії та еталонного зразка і переводять відповідне значення оптичної густини за допомогою калібрувального графіка у грами.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на кількість грамів на літр за допомогою калібрувального графіка відносно еталонного зразка.

Для цього у пробірці вносимо 9 мл дистильованої води і 1 мл культуральної рідини. Кількість розведень становить 5-6 разів. Суміш перемішують при кожному розведенні. Після останнього розведення вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі (при довжині хвилі 540 нм) у кюветі товщиною 10 мм. Для більш точного визначення вимір проводять три рази поспіль і знаходять середнє значення. Те саме роблять з контрольним зразком який представляє собою розведене в стільки ж разів свіже поживне середовище для культивування. Після цього одержані значення оптичної густини віднімають і отримують різницю. За допомогою калібрувального графіка переводять це число у концентрацію біомаси в одиниці г/л (Gilcreas FW, 2009).

## 7.3 Аналіз біодеградації сирої нафти

Аналіз біодеградації проводився у дванадцяти 1 л колбах Ерленмейєра, що містять 500 мл середовища Бушнелла-Хасса. Стерильну сиру нафту (3% за обсягом) додавали в кожну колбу як єдине джерело вуглецю та енергії.

Інокулят (2%, за обсягом, 24-годинна культура) *P. aeruginosa* NCIM 5514 додають у шість пробірок, інші шість колб залишали як контроль, тобто, без інокулята.

Зразки із одної контрольної та одної тестової колби збирали з інтервалом у 12 днів для екстракції та аналізу сирової нафти. Зібрані зразки були вилучені та аналізували для перевірки загальної деградації нафтових вуглеводнів методом газової хроматографії. За зростанням стежили гравіметричним методом кожні 12 днів.

Усі аналізи проводилися у трьох серіях, і результати представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення (стандартне відхилення) (Varjani et al., 2015).

## 7.4 Контроль отриманого продукту

### 7.4.1 Визначення вологості

Визначення вологості препарату після сушіння буде проводитися за допомогою вологоміра радарного типу TRIME-GW.

TRIME-GW – пристрій для вимірювання вологості сипучих матеріалів. Суть методу його роботи полягає в тому, що діелектрична проникність будь-якого матеріалу залежить від вмісту в ньому води.



Рис.7.2. Вологомір TRIME-GW

Метод визначення вологості базується на розміщенні електродів датчика в масі сипучого матеріалу, створюючи в ньому високочастотне електромагнітне поле. Властивості електричного процесу, що протікає через ланцюг датчика, змінюються в залежності від діелектричної проникності (вологості) матеріалу. Порівняння отриманих значень з контрольними дозволяє точно визначити вологість матеріалу. Зазвичай вимірювання проводяться з усередненням на певному часовому інтервалі. Оскільки електромагнітне поле проникає в об'єм матеріалу (зазвичай 1 ... 2 дм<sup>3</sup>) і глибину частинок різних фракцій, результати вимірювань відображають реальну вологість по всьому об'єму, який охоплює датчик. Обробка отриманих даних та можливість інтеграції датчика в будь-яку систему регулювання дозволяють використовувати вологоміри, наприклад TRIME-GW, в автоматизованих процесах сушіння для вирішення завдань вимірювання та контролю вологості матеріалів. (Sams C.E., Zivanovic S. 2004).

#### **7.4.2 Визначення кількості життєздатних клітин**

Проводження висіву на щільних поживних середовищах, застосовуючи чашковий метод Коха, є популярним способом визначення чисельності живих клітин у різних природних середовищах та лабораторних культурах. Цей метод ґрунтується на принципі Коха, згідно з яким кожна колонія представляє собою потомство однієї клітини, що дозволяє оцінити вихідний вміст мікроорганізмів у досліджуваній суспензії. Результати виражаються не в числі клітин, а в умовних одиницях - колонієутворювальних одиницях (КУО).

Перший етап - приготування розведень. За допомогою стерильної води або 0,9%-ного розчину NaCl готують послідовні розведення, зазвичай використовуючи однаковий коефіцієнт розведення, наприклад, 10. Розведення приготують у стерильних пробірках, додавши до них досліджувану суспензію.

Другий етап - посів. Суспензію розміщують на поверхні агаризованих середовищ стерильною піпеткою, розподіляючи її за допомогою стерильного шпателя. Висів проводять з трьох останніх розведень, роблячи паралельні висіви. Глибинний посів виконують, вводячи суспензію у розплавлене агаризоване середовище, яке потім застигається в чашці Петрі.

Третій етап - підрахунок колоній. Кількість вирослих колоній підраховують після інкубації протягом 2-15 діб. Обирають розведення, з якого виростає від 30-50 до 100-150 колоній, і обчислюють середню кількість для отримання результатів. Якщо кількість колоній менше 10, то такі результати не враховують при розрахунках.

Кількість клітин в 1 мл досліджуваного субстрату обчислюють за формулою:

$$M = a \times \frac{10^n}{V}$$

де  $M$  – кількість клітин в 1 мл суспензії;  $a$  – середня кількість колоній при висіві розведення, з якого зроблений висів;  $V$  – об'єм суспензії, узятий для посіву, мл;  $10^n$  – коефіцієнт розведень (Красінько В. О., Волошина І. М. 2014).

## Карта постадійного контролю виробництва

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
<b>ТП 1. Відділення біомаси</b>				
Кт 1.1. Центрифугування	Температура, частота обертів центрифуги, час	Тахометр технічний, термометр технічний, годинник	Всі показники визначаються безперервно	$t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 40\text{ хв}$ , $\omega = 10\ 000\text{ г}$
<b>ТП 2. Отримання напівфабрикату</b>				
Кт 2.1. Змішування біомаси із біологічними носіями	Тривалість та частота перемішування.	Тахометр технічний, годинник,	Всі показники визначаються під час процесу	$\tau = 10\text{-}15\text{ хв}$ , $\omega = 75\text{-}80\text{ г}$
<b>ТП 3. Сушіння суміші</b>				
Кт 3.1. Сушіння на стрічковій сушарці	Температура, тривалість процесу, вологість	Термометр технічний, годинник, вологомір	Під час процесу, вологість перевіряють після процесу	$t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\tau = 30\text{ хв}$ , $W = 20\text{ \%}$
<b>ТП 4. Подрібнення та просіювання</b>				
Кт 4.1. Подрібнення	Висушений препарат, час, діаметр часток	Годинник	Діаметр часток задається перед подрібненням	$\tau = 30\text{ хв}$ , $d = 2\text{ мм}$
Кт 4.2. Просіювання	Діаметр часточок продукту, час	Ситовий аналіз, годинник	Після подрібнення	$\tau = 30\text{ хв}$ , $d = 2\text{ мм}$
<b>ТП 5. Фасування, пакування та маркування</b>				
Кт 5.1. Фасування готового препарату	Кількість препарату, КУО, вологість	Ваги, визначення КУО, методом Коха, вологомір	Під час пакування	$m = 50\text{ кг}$ , $1 \times 10^9\text{ КУО/г}$ , $W = 20\text{ \%}$
Кт 5.2. Маркування	Правильність маркування	Правильність маркування згідно до вимог	Після нанесення маркування	Правильність маркування
Кт 5.3. Пакування на піддоні	Кількість мішків на піддоні	Підрахунок	Підрахунок під час маркування	Кількість мішків на піддоні

## РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

### 8.1. Сфера застосування

Ці технічні умови поширюються на біопрепарат на основі біомаси мікроорганізмів для очищення водного середовища від забруднень нафтою та нафтопродуктами, ліквідації аварійних розливів нафти, нафтопродуктів, та може бути використаний для очищення промислових, господарсько-побутових стічних та зливових вод.

### 8.2. Технічні вимоги

#### 8.2.1. Основні характеристики

Таблиця 8.1

№	Показник	Характеристика
1	Біологічний носій	Торф ,подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм), пісок морський ,подрібнені водорості
2	Основа	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 5514
3	Абсорбційна ємність	1:4 ~1:8
4	Концентрація мікоорганізмів	10 <sup>9</sup> на 1 г носію
5	Властивості	Має гідрофобні та плавучі властивості. Не має запаху
6	Екологічні та біологічні властивості	Екологічно чистий, не токсичний, безпечний для людини, тварин та навколишнього середовища.
7	Структура	Дисперсний склад із волокнистими включеннями.
8	Колір	Коричневий
10	Речовини, що абсорбуються	Нафта, нафтопродукти, моторні та технічні масла, розчинники, гідравлічні рідини та ін..
11	Десорбція	Майже відсутня
12	Фасування	50 кг

					НУХТ БТЕК 02.01.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Філь І.А.				РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ТЕХНІЧНИХ УМОВ НА ВИПУСК ТОВАРНОЇ ФОРМИ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Воронцов О.О.						61	92
Рецензент						<b>Кафедра БТМ</b> <sup>60</sup>		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

*Продовження таблиці 8.1*

13	Умови зберігання	Препарат зберігається в упаковках підприємства-виробника у закритих складських приміщеннях, захищених від попадання атмосферних опадів.
14	Вологість	20 %
15	Температура зберігання	від -25°C до +50°C
16	Термін зберігання	5 років

### 8.2.2. Пакування

Біопрепарат на основі біомаси мікроорганізмів має бути упакован у поліпропіленові мішки з поліетиленовим вкладишем згідно з ДСТУ 7275:2012 або іншими чинними нормативними документами.

Допускається пакування біопрепарату на основі біомаси мікроорганізмів у паперові мішки, пластикові бочки згідно контракту.

Маса нетто спожиткового пакування має бути 50 кг з граничними відхилами від номінальної маси  $\pm 1,5\%$ .

### 8.2.3. Маркування

Маркування споживчої тари повинно відповідати ДСТУ 4260:2003.

На кожній одиниці спожиткового пакування прикріплюють етикетку, на якій має бути розміщено таку інформацію:

- назва підприємства-виробника, адреса і номер телефону;
- назва;
- інструкція до користування;
- маса транспортного пакування;
- номер партії;
- термін зберігання;
- дата виготовлення;

– позначення цього стандарту;

На кожному транспортному пакуванні має бути нанесена етикетка з позначенням такої інформації:

– назва підприємства-виробника, адреса і номер телефону;

– назва;

– маса транспортного пакування;

– номер партії;

– термін зберігання;

– дата виготовлення;

– позначення цього стандарту;

– номер приймачника технічного контролю підприємства-виробника.

Маркування товару виконують державною мовою, а у разі експорту за межу України – додатковою мовою, що передбачена контрактом на постачання.

### 8.3. Вимоги безпеки

8.3.1. Сировинні матеріали необхідно зберігати у спеціально відведених для цього приміщеннях згідно з вимогами нормативних документів.

8.3.2. Під час виготовлення і зберігання біопрепарату на основі біомаси бактерій не повинні виділятися в навколишнє середовище шкідливі речовини у кількостях, що перевищують гранично допустимі концентрації згідно з чинним нормативним документом.

8.3.3. Виробничі і побутові приміщення мають відповідати вимогам GMP.

8.3.4. Виробничі приміщення мають бути обладнані системами вентиляції та опалення згідно з ДСТУ EN 775:2005.

8.3.5. Мікроклімат виробничих приміщень має відповідати санітарним вимогам згідно з ДСН 3.3.6.042.

8.3.6. Виробничі приміщення повинні бути обладнані водопровідною системою і каналізацією згідно зі СНиП 2.04.01, питною водою згідно з ГОСТ 2874.

8.3.7. Освітленість робочих місць має відповідати вимогам ДБН В.2.5-28.

8.3.8. Під час виробництва треба дотримуватися вимог ДСТУ EN 775:2005, ГОСТ 12.3.002-75, GMP та санітарних правил організації технологічних процесів згідно з СП 1042.

8.3.9. Технологічне обладнання повинне бути заземлене відповідно до вимог ГОСТ 12.2.007.0. Комунікації мають бути заземлені від статичної електрики згідно з ГОСТ 12.1.016.

8.3.10. У виробничих приміщеннях треба дотримуватися вимог щодо пожежної безпеки згідно з ДСТУ 9115:2021.

Виробничі приміщення мають бути оснащені первинними засобами пожежогасіння згідно з НАПБ А. 01.001.

8.3.11. Рівні шуму та вібрації на робочих місцях під час виготовлення біопрепарату на основі біомаси мікроорганізмів не мають перевищувати величин, установлених згідно з ДСТУ ГОСТ 12.1.012, ГОСТ 12.1.003, ДСН 3.3.6.037, ДСН 3.3.6.039. Безпечне експлуатування технологічного обладнання треба здійснювати відповідно до вимог інструкцій з експлуатування конкретного обладнання, технологічних інструкцій та інструкцій з охорони праці.

8.3.12. Інструктаж з охорони праці працівників проводять згідно з ДНАОП 0.00-4.12 і відповідними нормативними документами з охорони праці, затвердженими у встановленому порядку.

8.3.13. Навантажувальні та розвантажувальні роботи проводять, дотримуючись вимог щодо безпеки згідно з ГОСТ 12.3.009.

8.3.14. Працівники повинні бути забезпечені засобами індивідуального захисту згідно з ДНАОП 0.00-4.26: спецодягом – згідно з ГОСТ 27574 і ГОСТ 27575, спецвзуттям – згідно з ДСТУ 3242, засобами індивідуального захисту рук – згідно з ГОСТ 12.4.010.

#### 8.4. Вимоги охорони довкілля

8.4.1. Охорону ґрунтів від забруднення побутовими і виробничими відходами забезпечують згідно з Державними санітарними нормами та правилами утримання територій населених місць від ДСанПін 2.2.7.029.

8.4.2. Рідкі відходи, що утворюються в процесі виробництва наночастинок срібла, використовують повторно для підігріву та охолодження обладнання.

8.4.3. Контролюють скидання стічних вод згідно з СанПиН 4630.

8.4.4. Контролюють наявність радіонуклідів у сировині згідно з чинним нормативним документом.

#### 8.5. Правила приймання

8.5.1. Біопрепарат на основі біомаси мікроорганізмів приймають партіями. Партією вважають кількість біопрепарату, яка не відрізняється за своїми властивостями, виготовлена за один календарний період, за однією технологією та з однорідних сировинних матеріалів. Кожну партію супроводжують одним документом про якість.

8.5.2. Кожну партію біопрепарату на основі біомаси мікроорганізмів під час відвантаження споживачеві супроводжують документом установленої форми, який містить:

– назву продукції;

- назву підприємства-виробника;
- призначення та інструкцію;
- вид споживчого пакування;
- номінальну масу і об'єм;
- номер партії;
- дату виготовлення;
- позначення цього стандарту;
- умови зберігання та транспортування;
- гарантійний строк зберігання;
- номер приймачника технічного контролю підприємства виробника.

8.5.3. Під час приймально-здавальних випробувань установлюють відповідність виготовленої продукції технологічній документації, де вказують показники якості комплексного мікробного препарату згідно технічних вимог до продукції.

8.5.4. Під час перевіряння об'єму виготовленої продукції та правильності маркування і пакування допускають не більше, ніж 1,5% відхилів у об'ємі від номінальних значень.

## 8.6. Методи контролювання

Для перевіряння якості препарату на основі біомаси мікроорганізмів здійснюють кваліфікаційні (сертифікаційні) випробування за всіма вимогами цього стандарту під час виготовлення продукції (проміжний контроль), а також після завершення, згідно таблиці 8.2, а також ДСТУ 8611:2016, ДСТУ 6042:2008, ДСТУ-П CEN/TS 15297.

### 8.6.1. Визначення вологості

Для визначення вологості використовують 3 ампули (флакони), якщо в кожній з них маса проби не менше 0,1 г.

У приміщенні з відносною вологістю трохи більше 50% відібрану пробу, поміщають рівним шаром попередньо зважену бюксу. Бюкси з пробями закривають кришками, зважують, знімають з них кришки і встановлюють в сушильний шафу на полицю. Початком сушіння слід вважати час досягнення температури 105°C контрольного термометра. Тривалість сушіння має становити 60 хв.

Після закінчення сушіння бюкси швидко закривають кришками і переносять їх в ексикатор для охолодження до кімнатної температури протягом не менше 30 хв, після чого бюкси зважують і результати зважування реєструють за формою:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100,$$

де  $m_0$  - маса бюкси без проби, г;

$m_1$  - маса бюкси з пробою до висушування, г;

$m_2$  - маса бюкси з пробою після висушування, г.

За остаточний результат випробування приймають середнє арифметичне результатів трьох паралельних визначень.

#### 8.6.2. Концентрація мікроорганізмів

Для визначення загального вмісту клітин в 1 см<sup>3</sup> та їх прямого підрахунку використовують лічильну камеру.

Для прямого мікроскопування готують препарат "розчавлена крапля". Краплю проби, що визначається, після ретельного збовтування не менше 1 хв сухою стерильною скляною паличкою або бактеріологічною петлею наносять на сітку лічильної камери і покривають шліфованим спеціальним покривним склом розміром 18 x 18, товщиною (0,30 +/- 0,05) мм. При необхідності розводять пробу, так як в одному великому квадраті число клітин

мікроорганізмів не повинно перевищувати 60 - 80, а в п'яти квадратах - 600. Рідина має бути рівномірно розподілена поверхнею сітки, без бульбашок. Покривне скло притискають великими пальцями до бокових майданчиків лічильної камери і притирають до появи райдужних (Ньютонівських) кілець. При необхідності надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером.

Підрахунок клітин починають через 3 - 5 хв після заповнення лічильної камери, для того, щоб клітини осіли і були видно під мікроскопом в одній площині. Лічильну камеру кладуть на столик мікроскопа та знаходять у полі зору сітку. Підрахунок ведуть у п'яти великих квадратах, що розташовані по діагоналі або по кутах і в центрі сітки. Враховують усі клітини, що лежать у квадраті сітки, а також перетинають верхню та праву сторони квадрата, якщо наполовину або здебільшого вони розташовані всередині квадрата. Клітини, більша половина яких знаходиться в іншому квадраті, не підраховують. Точність визначення залежить від того, наскільки щільно покривне скло притерто до поверхні камери, тому підрахунок проводять кілька разів. Загальна кількість підрахованих клітин має бути не менше ніж 600.

Підрахунок проводять не менш ніж двічі, заповнюючи та підраховуючи дві сітки, і знаходять середньоарифметичне значення результатів у п'яти великих квадратах.

Об'єм одного великого квадрата у лічильній камері дорівнює  $1/250 \text{ мм}^3$ , відповідно обсяг п'яти квадратів дорівнює  $5/250$  або  $1/50 \text{ мм}^3$ . Для визначення кількості клітин в  $1 \text{ см}^3$  ( $1000 \text{ мм}^3$ ) проби потрібно середню суму кількості клітин у п'яти великих квадратах помножити на 50 000. Число мікроорганізмів в  $1 \text{ см}^3$  проби обчислюють за формулою:

$$M = 50\,000 \times a \times n,$$

де  $M$  - число мікроорганізмів у пробі, що визначається, млн клітин/ $\text{см}^3$ ;

50 000 – коефіцієнт перерахунку обсягу п'яти великих квадратів на  $1 \text{ см}^3$ ;

$a$  - загальна кількість підрахованих клітин у п'яти великих квадратах;

$n$  – кратність розведення.

### 8.6.3. Визначення мікроелементів

Вміст арсеніуму, кадмію, хрому, міді, ртуті, цинку та свинцю у препараті на основі біомаси мікроорганізмів визначають згідно з методикою, наведеною у ДСТУ-П CEN/TS 15297. Вміст домішок повинен складати не більше 0,1%.

Таблиця 8.2

Ч.ч.	Назва показника	Документ для визначення	Примітки
1	Вміст вологи	ДСТУ 8611:2016	Визначають обов'язково
2	Концентрація мікроорганізмів	ДСТУ 6042:2008	
3	Вміст арсеніуму	ДСТУ-П CEN/TS 15297	
4	Вміст кадмію		
5	Вміст хрому		
6	Вміст міді		
7	Вміст ртуті		
8	Вміст цинку		
9	Вміст свинцю		

### 8.7. Транспортування та зберігання

8.7.1. Біопрепарат слід зберігати у закритій споживчій тарі за температури від  $-25^{\circ}\text{C}$  до  $+50^{\circ}\text{C}$  до п'яти років від дати маркування у призначеному для цього місці.

8.7.2. Біопрепарат на дерев'яних піддонах перевозять у сухих транспортних засобах з обов'язковим запобіганням їх зволоження, забруднення та механічних ушкоджень відповідно до правил перевезення вантажів та ДСТУ 8084:2015, ДСТУ 4623-2006.

## 8.8. Гарантії виробника

8.8.1. Виробник гарантує відповідність якості біопрепарату на основі біомаси мікроорганізмів вимогам цих технічних умов вразі дотримання споживачем наведених умов транспортування та зберігання.

8.8.2. Гарантійний строк зберігання біопрепарату на основі біомаси мікроорганізмів – 5 роки від дати його виготовлення.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dunphy LJ, Kolling GL, Jenior ML, Carroll J, Attai AE, Farnoud F, Mathers AJ, Hughes MA, Papin JA. Multidimensional Clinical Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals Complex Relationships between Isolate Source, Morphology, and Antimicrobial Resistance. *mSphere*. 2021 Aug 25;6(4):e0039321. doi: 10.1128/mSphere.00393-21. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34259555; PMCID: PMC8386403.
2. Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Aug;71(8):4809-21. doi: 10.1128/AEM.71.8.4809-4821.2005. PMID: 16085879; PMCID: PMC1183349.
3. Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*. 1999 Nov;34(3):399-413. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01586.x. PMID: 10564483.
4. Li P, Cai Q, Lin W, Chen B, Zhang B. Offshore oil spill response practices and emerging challenges. *Mar Pollut Bull*. 2016 Sep 15;110(1):6-27. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.020. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27393213.
5. Bhushan B. Bioinspired oil-water separation approaches for oil spill clean-up and water purification. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2019 Jul 29;377(2150):20190120. doi: 10.1098/rsta.2019.0120. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31177955.
6. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія // Підручник. – К.: НУХТ. – 2009. – 336 с.

7. Dean D.A., Evans E.R., Hall I.H. *Pharmaceutical Packaging Technology* (1st ed.), 2000 – 646. doi: <https://doi.org/10.1201/b1265>
8. Пирог Т.П., Ключка Л.В. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
9. Cabeen MT, Leiman SA, Losick R. Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2016 Feb;99(3):557-70. doi: 10.1111/mmi.13250. Epub 2015 Nov 27. PMID: 26483285; PMCID: PMC5130288.
10. Gilcreas FW. Future of standard methods for the examination of water and wastewater. *Health Lab Sci.* 2009 Jul;4(3):137-41. PMID: 6033010.
11. Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN) *Journal of Hazardous Materials*, 2010: 771-777 doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.101
12. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с
13. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Романовська В.А. Пошук метанотрофних продуцентів екзополісахаридів. *Прикладна біохімія та мікробіологія*: 2001, Том 37, № 6. – С. 702-705

14. Xiao L, Xie B, Liu J, Zhang H, Han G, Wang O, Liu F. Stimulation of long-term ammonium nitrogen deposition on methanogenesis by Methanocellaceae in a coastal wetland. *Sci Total Environ.* 2017 Oct 1;595:337-343. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.279. Epub 2017 Apr 5. PMID: 28390312.
15. Sams C.E., Zivanovic S., Charron C.S., Wu T., Blodgett A.B., Conway W.S. Fungal chitosan extracts are as effective in reducing decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Penicillium solitum* as commercial seashell chitosa. *Phytopathology.* 2004, 95 (1): 1145-1148
16. Xue J, Yu Y, Bai Y, Wang L, Wu Y. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Curr Microbiol.* 2015 Aug;71(2):220-8. doi: 10.1007/s00284-015-0825-7. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25917503.
17. Bovio E, Gnani G, Prigione V, Spina F, Denaro R, Yakimov M, Calogero R, Crisafi F, Varese GC. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Sci Total Environ.* 2017 Jan 15;576:310-318. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.064. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27788446.
18. Simister RL, Poutasse CM, Thurston AM, Reeve JL, Baker MC, White HK. Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. *Mar Pollut Bull.* 2015 Nov 15;100(1):327-333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.029. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26323859.
19. Wang C, Liu X, Guo J, Lv Y, Li Y. Biodegradation of marine oil spill residues using aboriginal bacterial consortium based on Penglai 19-3 oil spill accident, China. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018 Sep 15;159:20-27. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.04.059. Epub 2018 May 3. PMID: 29730405.

20. Varjani SJ, Upasani VN. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresour Technol.* 2016 Dec;222:195-201.
21. Assad Ahmed Al-Thukair, Karim Malik, Alexis Nzila, Biodegradation of selected hydrocarbons by novel bacterial strains isolated from contaminated Arabian Gulf sediment, *Journal of Scientific reports*, 2010 doi:10.1038/s41598-020-78733-0
22. Sakthipriya N, Doble M, Sangwai JS. Systematic investigations on the biodegradation and viscosity reduction of long chain hydrocarbons using *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Sci Process Impacts.* 2016 Mar;18(3):386-97.
23. Appolinario LR, Tschoeke D, Paixão RVS, Venas T, Calegario G, Leomil L, Silva BS, Thompson CC, Thompson FL. Metagenomics sheds light on the metabolic repertoire of oil-biodegrading microbes of the South Atlantic Ocean. *Environ Pollut.* 2019 Jun;249:295-304. doi: 10.1016/j.envpol.2019.03.007. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30901643.
24. Sun X, Kostka JE. Hydrocarbon-Degrading Microbial Communities Are Site Specific, and Their Activity Is Limited by Synergies in Temperature and Nutrient Availability in Surface Ocean Waters. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Jul 18;85(15):e00443-19. doi: 10.1128/AEM.00443-19. PMID: 31126938; PMCID: PMC6643229.
25. Ganesh Kumar A, Nivedha Rajan N, Kirubakaran R, Dharani G. Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Mar Pollut Bull.* 2019 Sep;146:741-750. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.07.006. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31426216.

- 26.Красінько В. О., Волошина І. М. Лабораторний практикум для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навчання / уклад.: В. О. Красінько, І. М. Волошина. – К.: НУХТ, 2014. – 147 с
- 27.Патент на винахід № 95859 “Біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів і спосіб очищення води та/або ґрунту від забруднень нафтою та нафтопродуктами”. Дата публікації: 12.09.2011, Бюл. № 17, 2011р.
- 28.Maity JP, Huang YH, Lin HF, Chen CY. Variation of Microbial Diversity in Catastrophic Oil Spill Area in Marine Ecosystem and Hydrocarbon Degradation of UCMs (Unresolved Complex Mixtures) by Marine Indigenous Bacteria. *Appl Biochem Biotechnol.* 2021 May;193(5):1266-1283. doi: 10.1007/s12010-020-03335-5. Epub 2020 May 23. PMID: 32445124.
- 29.Ganesh Kumar A, Nivedha Rajan N, Kirubakaran R, Dharani G. Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Mar Pollut Bull.* 2019 Sep;146:741-750. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.07.006. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31426216.
- 30.Michaud L, Lo Giudice A, Saitta M, De Domenico M, Bruni V. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment. *Mar Pollut Bull.* 2014 Sep;49(5-6):405-9. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.026. PMID: 15325208.
- 31.Bayat Z, Hassanshahian M, Hesni MA. Enrichment and isolation of crude oil degrading bacteria from some mussels collected from the Persian Gulf. *Mar Pollut Bull.* 2015 Dec 15;101(1):85-91. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.021. Epub 2015 Nov 12. PMID: 26581816.

32. Simister RL, Poutasse CM, Thurston AM, Reeve JL, Baker MC, White HK. Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. *Mar Pollut Bull.* 2015 Nov 15;100(1):327-333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.029. Epub 2015 Aug 29. PMID: 26323859.
33. Uribe-Flores MM, Cerqueda-García D, Hernández-Nuñez E, Cadena S, García-Cruz NU, Trejo-Hernández MR, Aguirre-Macedo ML, García-Maldonado JQ. Bacterial succession and co-occurrence patterns of an enriched marine microbial community during light crude oil degradation in a batch reactor. *J Appl Microbiol.* 2019 Aug;127(2):495-507. doi: 10.1111/jam.14307. Epub 2019 Jun 3. PMID: 31077511.
34. Chen Q, Li J, Liu M, Sun H, Bao M. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PLoS One.* 2017 Mar 27;12(3):e0174445. doi: 10.1371/journal.pone.0174445. PMID: 28346510; PMCID: PMC5367712.
35. Lee DW, Lee H, Kwon BO, Khim JS, Yim UH, Kim BS, Kim JJ. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environ Pollut.* 2018 Oct;241:254-264. doi: 10.1016/j.envpol.2018.05.070. Epub 2018 May 26. PMID: 29807284.
36. Murphy SMC, Bautista MA, Cramm MA, Hubert CRJ. Diesel and Crude Oil Biodegradation by Cold-Adapted Microbial Communities in the Labrador Sea. *Appl Environ Microbiol.* 2021 Sep 28;87(20):e0080021. doi: 10.1128/AEM.00800-21. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34378990; PMCID: PMC8478444.
37. Wang C, Liu X, Guo J, Lv Y, Li Y. Biodegradation of marine oil spill residues using aboriginal bacterial consortium based on Penglai 19-3 oil

- spill accident, China. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018 Sep 15;159:20-27. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.04.059. Epub 2018 May 3. PMID: 29730405.
38. Li X, Zhao L, Adam M. Biodegradation of marine crude oil pollution using a salt-tolerant bacterial consortium isolated from Bohai Bay, China. *Mar Pollut Bull.* 2016 Apr 15;105(1):43-50. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.073. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26952993.
39. International Convention for the Prevention of Pollution from Ships, 1973, as modified by the Protocol of 1978 relating thereto (MARPOL 73/78).
40. Southward AJ, Langmead O, Hardman-Mountford NJ, Aiken J, Boalch GT, Dando PR, Genner MJ, Joint I, Kendall MA, Halliday NC, Harris RP, Leaper R, Mieszkowska N, Pingree RD, Richardson AJ, Sims DW, Smith T, Walne AW, Hawkins SJ. Long-term oceanographic and ecological research in the Western English Channel. *Adv Mar Biol.* 2015;47:1-105. doi: 10.1016/S0065-2881(04)47001-1. PMID: 15596166.
41. Yaghmour F, Els J, Maio E, Whittington-Jones B, Samara F, El Sayed Y, Ploeg R, Alzaabi A, Philip S, Budd J, Mupandawana M. Oil spill causes mass mortality of sea snakes in the Gulf of Oman. *Sci Total Environ.* 2022 Jun 15;825:154072. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154072. Epub 2022 Feb 22. PMID: 35217042.
42. Cucco A, Rindi L, Benedetti-Cecchi L, Quattrocchi G, Ribotti A, Ravaglioli C, Cecchi E, Perna M, Brandini C. Assessing the risk of oil spill impacts and potential biodiversity loss for coastal marine environment at the turn of the COVID-19 pandemic event. *Sci Total Environ.* 2023 Oct 10;894:164972. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164972. Epub 2023 Jun 17. PMID: 37336396.

43. Wolok, E., Barafi, J., Joshi, N., Girimonte, R., & Chakraborty, S. (2020). Study of bio-materials for removal of the oil spill. *Arabian Journal of Geosciences*, 13, 1-11.
44. Dordevic, M., Sabalja, D., Mohovic, D., & Breie, D. (2022). Optimisation Methodology for Skimmer Device Selection for Removal of the Marine Oil Pollution. *Journal of marine science and engineering*, 10(7), 925.
45. Li, P., Qiao, Y., Zhao, L., Yao, D., Sun, H., Hou, Y., ... & Li, Q. (2015). Electrospun PS/PAN fibers with improved mechanical property for removal of oil from water. *Marine pollution bulletin*, 93(1-2), 75-80.
46. Sabir, S. (2015). Approach of cost-effective adsorbents for oil removal from oily water. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(17), 1916-1945.
47. Laitinen, O., Suopajärvi, T., Österberg, M., & Liimatainen, H. (2017). Hydrophobic, superabsorbing aerogels from choline chloride-based deep eutectic solvent pretreated and silylated cellulose nanofibrils for selective oil removal. *ACS applied materials & interfaces*, 9(29), 25029-25037.
48. Wahi, R., Chuah, L. A., Choong, T. S. Y., Ngaini, Z., & Nourouzi, M. M. (2013). Oil removal from aqueous state by natural fibrous sorbent: An overview. *Separation and Purification Technology*, 113, 51-63.
49. Hoang, A. T., Nguyen, X. P., Duong, X. Q., & Huynh, T. T. (2021). Sorbent-based devices for the removal of spilled oil from water: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 28876-28910.
50. Zamparas, M., Tzivras, D., Dracopoulos, V., & Ioannides, T. (2020). Application of sorbents for oil spill cleanup focusing on natural-based modified materials: A review. *Molecules*, 25(19), 4522.

51. Rajaković-Ognjanović, V., Aleksić, G., & Rajaković, L. (2012). Governing factors for motor oil removal from water with different sorption materials. *Journal of hazardous materials*, 154(1-3), 558-563.
52. Cojocaru, C., Macoveanu, M., & Cretescu, I. (2011). Peat-based sorbents for the removal of oil spills from water surface: Application of artificial neural network modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384(1-3), 675-684.
53. Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S., Upasani, V.N., 2015. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat. India. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*103, 116–124.
54. Goveas LC, Selvaraj R, Vinayagam R, Alsaiari AA, Alharthi NS, Sajankila SP. Nitrogen dependence of rhamnolipid mediated degradation of petroleum crude oil by indigenous *Pseudomonas* sp. WD23 in seawater. *Chemosphere*. 2022 Oct;304:135235.

## ДОДАТКИ

Міністерство освіти і науки України  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

---



## ХІІ МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ТЕХНІЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ

**"Наукові проблеми харчових технологій та промислової  
біотехнології в контексті євроінтеграції"**

## ПРОГРАМА ТА ТЕЗИ МАТЕРІАЛІВ

*7 листопада 2023 р.*

**КИЇВ НУХТ 2023**

**Продукти мікробного синтезу для знешкодження нафтових розливів в морських акваторіях**

І. А. Філь, О. О.

Воронцов

*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

**Вступ.** Нафта є одним з найважливіших сировинних матеріалів для виробництва нафтових палив (наприклад бензину та гасу) та продуктів хімічних реагентів (наприклад фармацевтичних препаратів, розчинників, добрив та пластмас). У зв'язку зі зростанням світового попиту на нафту, здійснюється дедалі більше таких видів діяльності, як видобуток, переробка та транспортування нафти. При цьому близько половини цих нафтопродуктів транспортується світом морським шляхом. Отже, у всьому світі спостерігається загроза збільшення аварій з розливами або витокami нафти, таких як розливи з нафтових свердловин, трубопроводів, бурових установок чи транспортних танкерів [1].

**Матеріали та методи.** Пошук та ґрунтовний аналіз сучасної наукової літератури, присвяченої дослідженню ефективності застосування біопрепаратів на основі біомаси мікроорганізмів для очищення морських акваторій від нафти та нафтопродуктів.

**Результати і обговорення.** Ліквідація наслідків аварійних розливів нафти здійснюється, як правило, у два етапи - механічний та застосування нафтових сорбентів. Механічний етап забезпечує ліквідацію джерела забруднення і збір основної маси нафти, що розлилася і застосовується як екстрений захід. Після збору основного обсягу нафти завжди залишається її значна кількість, що негативно впливає на біоценоз забрудненої ділянки, та на цьому етапі застосовують нафтові сорбенти.

У якості природних сорбентів перспективним є використання біопрепаратів на основі біомаси мікроорганізмів. Основними перевагами яких

є те, що вони не потребують подальшого збору та є ефективними не тільки на поверхні, а й у всій товщі водяного шару і на дні водоймищ.

Дослідження вчених з Індійського університету перспективних досліджень, Університету нафти і мінералів та Технологічного інституту Мадраса показали, що одними із найефективніших мікроорганізмів-біодеструкторів нафти є *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 (біодеградація 100%, 120 год), *Proteus mirabilis* T2A12001 (біодеградація 95%, 360 год), *Pseudomonas fluorescens* PMMD3 (біодеградація 93%, 960 год). Серед даних штамів перевагу має *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 через найвищий рівень біодеградації нафти та нафтопродуктів при найменшому часі культивування [2-4]. Нафта та нафтопродукти є пріоритетними забруднювачами біосфери, зокрема морських акваторій. Використання препаратів на основі біомаси мікроорганізмів для очищення є перспективним та має ряд переваг над іншими видами очищення. Потребує вдосконалення форма випуску біодеградантів та спосіб їх зберігання при транспортуванні в умовах підвищеної вологості та можливості намокання.

**Висновки.** Для отримання якісного продукту, стійкого до впливу негативних зовнішніх факторів, та оптимальною економічною ефективністю виробництва пропонується порівняно дешевий біоносій. В якості біологічного носія для *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 найкраще підходить суміш із торфу, подрібнених стулок мідій, піску морського та подрібнених водоростей. Завдяки різній питомій вазі складових носія бактерії поступово опускаються на дно, що дозволяє сорбувати і деструктувати нафту та нафтопродукти не лише з поверхні, а й зі всієї товщі водяного шару і дна водоймищ та дозволяє отримати 100% біодеградації нафтового забруднення водойми.

## Література

1. Bovio E, Gnavi G, Prigione V, Spina F. The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and

- potential application in bioremediation. *Sci Total Environ.* 2017 Jan 15;576:310-318. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.10.064. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27788446.
2. Varjani SJ, Upasani VN. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresour Technol.* 2016 Dec;222:195-201.
  3. Assad AhmedAl-Thukair. Biodegradation of selected hydrocarbons by novel bacterial strains isolated from contaminated Arabian Gulf sediment, *Journal of Scientific reports*, 2010 doi:10.1038/s41598-020- 78733-0
  4. Sakthipriya N, Doble M, Sangwai JS. Systematic investigations on the biodegradation and viscosity reduction of long chain hydrocarbons using *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *Environ Sci Process Impacts.* 2016 Mar;18(3):386-97.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95859 (13) C2  
(51) МПК  
C02F 3/34 (2006.01)  
B09C 1/10 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) БІОПРЕПАРАТ ДЛЯ СОРБЦІЇ І ДЕСТРУКЦІЇ ВУГЛЕВОДНІВ І СПОСІБ ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ТА/АБО ҐРУНТУ ВІД ЗАБРУДНЕНЬ НАФТОЮ ТА НАФТОПРОДУКТАМИ

1

2

(21) а201004765  
(22) 21.04.2010  
(46) 12.09.2011  
(46) 12.09.2011, Бюл.№ 17, 2011 р.  
(72) ІВАНИЦЯ ВОЛОДИМИР ОЛЕКСІЙОВИЧ, ГУДЗЕНКО ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА, БЕЛЯЄВА ТАМАРА ОЛЕКСІВНА, БОБРЕШОВА НАТАЛІЯ СТЕПАНІВНА, КОЖАНОВА ГАЛИНА АНДРІВНА, КРИВИЦЬКА ТЕТЯНА МИКОЛАЇВНА, КОНУП ІГОР ПЕТРОВИЧ, СОЛОВІЙОВ ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ФІЛАТОВ КИРИЛО ДМИТРОВИЧ, БАРАНОВ ОЛЕКСАНДР ОПАНАСОВИЧ  
(73) ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА  
(56) UA 45191, U, 26.10.2009  
UA 59337, C2, 15.09.2003  
RU 2033975, C1, 30.04.1995  
UA 43965, C2, 15.01.2002  
RU 2031860, C1, 27.03.1995  
RU 2122980, C1, 10.09.1998  
EP 1534637, B1, 16.08.2006  
JP 5309369, A, 22.11.1993  
(57) 1. Біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів нафти та нафтопродуктів, що містить бактерії-деструктори вуглеводнів нафти на комплексному носії, який відрізняється тим, що як бактерії-

деструктори вуглеводнів нафти містить чотири штами бактерій роду *Pseudomonas*: 2АБ<sub>х</sub>, ТБН<sub>х</sub>, І-17<sub>(1)х</sub>, І-17<sub>(ш)х</sub>, які іммобілізовані на носії такого складу, % мас.:

торф	75
сіно	10
солома	8
природні мінерали	7,

або

торф	70
подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм)	10
пісок морський	10
подрібнені водорості	10,

причому вміст бактерій у перерахунку на бактеріальні клітини не менше 10<sup>7</sup> в 1 г носія.

2. Спосіб очищення води та/або ґрунту від забруднень нафтою та/або нафтопродуктами, що включає оброблення забруднених води та/або ґрунту мікроорганізмами, здатними розкладати нафту та нафтопродукти, який відрізняється тим, що як мікроорганізми, здатні розкладати нафту та нафтопродукти, використовують біопрепарат за п. 1, який розпоршують над забрудненою нафтою та/або нафтопродуктами поверхню водної або ґрунту.

Винахід належить до охорони навколишнього середовища, зокрема, до засобів очищення води і ґрунту від забруднень нафтою та нафтопродуктами, і може використовуватися для ліквідації аварійних розливів нафти і нафтопродуктів на території нафтопереробних підприємств, акваторій портів та терміналів, де перевантажують нафту та нафтопродукти, сільськогосподарських земель, де відбулося проникнення нафти та нафтопродуктів у глибокі шари ґрунту.

Нафта та нафтопродукти належать до пріоритетних забруднювачів біосфери і проблема вдосконалення технологій очищення забруднених нафтопродуктами ґрунтів і водоймищ залишається актуальною.

Досягнутий рівень технологій очищення навколишнього середовища від нафти та нафтопро-

дуктів біологічними засобами за допомогою мікроорганізмів характеризується такими прикладами.

Відомий UA № 45191, U, "Спосіб очищення води і ґрунту від паливно-мастильних матеріалів", опубл. 26.10.2009 р., Бюл. № 20. За цим способом попередньо розмножують у воді в окремих ємностях у необхідних об'ємах мікроорганізми, здатні розкладати паливно-мастильні матеріали, після чого підготовлені об'єми мікроорганізмів вводять у забруднену воду або ґрунт методом розпоршування над поверхню води або ґрунту з плівкою паливно-мастильних матеріалів.

Відомий спосіб не достатньо придатний для очищення ґрунту і води від нафти та нафтопродуктів, особливо у випадках, коли вони проникли в глибокі шари ґрунту або емульговані у воді, тому що розпоршені мікроорганізми деструкують ли-

(19) UA (11) 95859 (13) C2

ше плівку нафтопродуктів на поверхні ґрунту і водоймищ, крім того, не всі види мікроорганізмів-деструкторів нафти адаптовані до життя у водному середовищі.

Відомий UA № 48290, U "Спосіб очищення води і ґрунту від нафти" опубл. 10.03.2010 р., Бюл. № 5, згідно з яким попередньо в окремих ємностях у воді розмножують у необхідних обсягах мікроорганізми, здатні розкласти нафту, після чого підготовлені обсяги мікроорганізмів вводять у забруднену нафтою воду або ґрунт методом розпоршування над поверхню води або ґрунту.

Відомий спосіб не достатньо придатний для очищення води і ґрунту від нафти та нафтопродуктів, особливо у випадках, коли вони проникли в глибокі шари ґрунту або емульговані у воді, тому що розпоршені мікроорганізми деструкують лише плівку нафти на поверхні ґрунту і водоймищ, до того ж не всі види мікроорганізмів-деструкторів нафти адаптовані до життя у водному середовищі.

Відомий патент RU №2033975, С1, "Спосіб получения бактериального препарата для очистки водной среды от загрязнений нефтепродуктами", опубл. 30.04.1995 р., визначений нами як найближчий аналог (прототип).

Цей спосіб передбачає нарощування біомаси бактерій на середовищі, що містить азот, фосфор, калій, і наступне її висушування. Як бактерії використовують штам бактерій *Pseudomonas fluorescens* 2-а ЦМГМ В-2256. Після нарощування біомаси бактерій у середовище додатково вносять перекис водню і хлорид кальцію в кількості  $10^6$  моль/л і 0,036-0,046 моль/л, відповідно, після чого перед висушуванням біомасу бактерій наносять на сфагновий торф 10 % вологості з розрахунку не менш  $10^9$  клітин на 1 г торфу.

Після внесення препарату на забруднену поверхню водного середовища препарат адсорбує на себе нафтову плівку, а бактерії деструкують нафту.

Відомий спосіб не достатньо придатний для очищення води і ґрунту від нафти та нафтопродуктів, особливо у випадках, коли вони проникли в глибокі шари ґрунту, емульговані у воді або осіли на дно водоймища.

Причина в тому, що нафта - це складна суміш вуглеводнів, головним чином парафінових і нафтенічних, у меншому ступені ароматичних. Крім відомих світлих нафтопродуктів таких як бензин, гас, дизельне паливо (солярка), технічних мастил, тобто паливно-мастильних матеріалів, нафта містить нафтенічні кислоти, асфальто-смолисті речовини, меркаптани, бітуми, що містять асфальтени, тіофени і теофани й інші. Тобто крім паливно-мастильних матеріалів нафта містить більш складні високомолекулярні вуглеводні з довголанцюговими молекулами, що важче піддаються біологічній деструкції при впливі мікроорганізмів. Тому застосування одного виду мікроорганізмів для повної деструкції всіх складових нафтопродуктів недостатньо ефективне. Крім того, торф, як речовина з малою питомою вагою, довгий час залишається на поверхні води й адсорбує тільки поверхневу плівку нафтопродуктів.

На підставі викладеного застосування способу

за прототипом є недостатньо ефективним.

Задачею, на вирішення якої спрямовано заявлений винахід, є створення біопрепарату, який може бути використаний для очищення усього шару води і дна водойми, а також ґрунтів забруднених нафтою і нафтопродуктами.

Поставлена задача вирішується створенням біопрепарату і його використанням таким чином.

Створено біопрепарат, для виготовлення якого проводять культивування бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти і нафтопродуктів, нарощування біомаси бактерій на середовищі, що містить азот, фосфор, калій, натрій, білковий компонент, дріжджовий екстракт, введення в середовище перекису водню і хлориду кальцію в кількості  $10^6$  моль/л і 0,036-0,046 моль/л, відповідно, та іммобілізацію бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти на комплексному носії, причому як бактерії-деструктори вуглеводнів нафти використовують чотири штами бактерій роду *Pseudomonas*: 2АБ<sub>1</sub>х, ТБНх, І-17<sub>(1)</sub>х, І-17<sub>(2)</sub>х, які іммобілізують на носії такого складу, % мас.:

торф	75
сіно	10
солома	8
природні мінерали	7,

ретельно перемішують до вмісту бактерій у перерахунку на бактеріальні клітини не менше  $10^7$  в 1 г носія, висушують при температурі 30 °С до вологості 10-20 %, складують та зберігають у герметично закритій тарі. При необхідності мікроорганізми разом з носієм розпоршують на забруднену поверхню ґрунту і проводять заходи по реабілітації забруднених земель.

Вказані бактерії-деструктори нафти можуть бути таким же чином іммобілізовані на носії і такого складу, % мас.:

торф	70
подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм)	10
пісок морський	10
подрібнені водорості	10.

При необхідності мікроорганізми разом з носієм розпоршують над забрудненою нафтою поверхню водойми. Завдяки різній питомій вазі складових носія мікроорганізми з різною швидкістю поступово опускаються на дно, що дозволяє сорбувати і деструкувати вуглеводні нафти не лише з поверхні, а й зі всієї товщі водяного шару і дна водоймищ.

Запропонований біопрепарат виготовляють таким чином.

У чотирьох біореакторах з рідким поживним середовищем що містить: азот ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) - 1,0 г/л, фосфор ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) - 3,0 г/л, калій ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) - 1,5 г/л, натрій ( $\text{NaCl}$ ) - 5 г/л, білковий компонент (пептон) - 10 г/л, дріжджовий екстракт - 5,0 г/л, культивують штами бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти роду *Pseudomonas*: 2АБ<sub>1</sub>х, ТБНх, І-17<sub>(1)</sub>х, І-17<sub>(2)</sub>х, виділені з води Чорного моря, тобто добре адаптовані до життя у навколишньому середовищі. Нарощують культури бактерій при рН 7,0-7,2 і температурі 30 °С до щільності 5 г/кг по сухій біомасі. Потім культуральні середовища об'єднують у консорціум чотирьох штамів бактерій, куди при інтенсивному перемішуванні послідовно

вводять пережис водню і хлорид кальцію в кількості  $10^{-6}$  моль/л і 0,036-0,046 моль/л, відповідно, для одержання біофлорів. Температура реакційного середовища (30 °C) сприяє стрімкому утворенню рясних біофлорів великого розміру, які швидко осідають на дно культиватора, у якому проводять флокуляцію. При цьому надосадова рідина швидко стає прозорою, а оптична густина рідкої культури консорціуму бактерій-деструкторів сягає 1,15 ( $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$  КУО/см<sup>3</sup>). Отримані біофлорки бактерій іммобілізують на біологічно позитивному носії, склад якого залежить від виду середовища, що потребує очищення. Для очищення забрудненого нафтою і нафтопродуктами ґрунту бактерій-деструкторів іммобілізують на носії, який містить такі складові, % мас.:

торф	75
сіно	10
солома	8
природні мінерали	7.

Іммобілізацію здійснюють методом напильовання сфлукуюваної культури бактерій з розрахунку 1 об'ємна частина сфлукуюваної культури бактерій на 5 частин носія. Під час інокуляції носій ретельно перемішують для того, щоб усі його компоненти рівномірно вбрали в себе частинки біофлорки до вмісту бактерій не менше ніж  $10^7$  в 1 г носія. Отриманий біопрепарат висушують при температурі 30 °C до вологості 10-20 %, складують та зберігають у герметично закритій тарі. При необхідності мікроорганізми разом з носієм розпорошують на забруднену поверхню ґрунту. Перед застосуванням біопрепарату для зниження концентрації нафтопродуктів у ґрунті, їх реструктуризують, а для відновлення водного й аераційного режимів - необхідних умов для активації самоочисних процесів у ґрунті і застосування біопрепарату, проводяться такі заходи.

На забруднену поверхню ґрунту наносять шар сорбентів, який містить подрібнене сіно (250 г/м<sup>2</sup>), солому (250 г/м<sup>2</sup>), природні мінерали (2 кг/м<sup>2</sup>), і бактерій-деструкторів нафти, іммобілізовані на носії (500 г/м<sup>2</sup>).

Як природні мінерали для сорбції нафти і нафтопродуктів можуть бути використані силікати, бентонітові глини, цеоліти, перліт, червоний шлам.

Особливої уваги, як за хімічним складом, так і з економічних причин, заслуговує червоний шлам. Він використовується для підвищення родючості ґрунтів, містить залізо, бор, нікель, марганець, фосфор, калій, кальцій, молібден, магній та інші мікроелементи. Внесення його в забруднений нафтопродуктами ґрунт сприяє хімічній деградації нафти завдяки лужній реакції, стимулює розвиток аборигенної нафтоокислюючої мікрофлори і спеціально внесених бактерій-деструкторів нафти і нафтопродуктів.

Здійснюють 2-3 кратне переорювання чи перемішування забрудненого ґрунту з внесеними сорбентами, бактеріями-деструкторами і незабрудненими нижніми шарами ґрунту.

У результаті проведення таких робіт концентрація нафтопродуктів знижується. Крім того, введення мінералів підвищує резистентність ґрунтових мікроорганізмів до нафтового забруднення,

збільшує їх сорбційну і деструктивну активність.

Після переорювання забруднену поверхню ґрунту обробляють рідкою культурою мікроорганізмів-деструкторів нафти (1 л/м<sup>2</sup>). Це дозволяє провести додатково інокуляцію всіх використаних сорбентів і забрудненого ґрунту фізіологічно активними бактеріями-деструкторами вуглеводнів нафти.

Обов'язковою умовою проведення біотехнологічних робіт є підтримка вологості ґрунту на рівні 60-70 % його повної вологоємності.

Потім оброблену ділянку засівають трав'янистими рослинами. Норми висіву насіння збільшують у півтора рази у порівнянні зі звичайними. Для закріплення ефекту очищення і рекультивативі забрудненого нафтою ґрунтів проводиться сидерація (загортання рослинної маси на глибину забрудненого шару ґрунту). Сидерація сприяє збільшенню комплексу органотрофних мікроорганізмів, що беруть участь у розкладанні рослинних залишків, і насичує забруднений ґрунт не тільки кінцевими продуктами розкладання (вуглець, азот, цукри, амінокислоти та ін.), але й активною ґрунтовою мікрофлорою, що також сприяє повнішому звільненню ґрунту від забруднення нафтопродуктами. Сидерацію проводять при температурі повітря вище 15 °C.

Зазначений комплекс заходів створює оптимальні умови для деструкції вуглеводнів нафти, створення структурованого ґрунтового покриву з рослинним елементом.

Для очищення від нафти і нафтопродуктів водного шару і дна водойм бактерій-деструкторів іммобілізують на носії, який містить такі складові, % мас.:

торф	70
подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм)	10
пісок морський	10
подрібнені водорості	10,

які ретельно перемішують до вмісту бактерій у перерахунку на бактеріальні клітини не менше  $10^7$  в 1 г носія, висушують при температурі 30 °C до вологості 10-20 %, складують та зберігають у герметично закритій тарі.

Використовують стулки мідій: *Mytilus galloprovincialis*, водорості: *Ceramium rubrum*, *Ulva rigida*, *Bryopsis plumosa*, *Cystoseira barbata*, *Enteromorpha intestinalis* та ін.

При необхідності очистки водоймищ від нафти і нафтопродуктів мікроорганізми разом з носієм вводять у воду шляхом розпорошування їх на поверхню забруднених водоймищ. Разом з носієм мікроорганізми опускаються на шар нафти, створюючи на його поверхні високу концентрацію мікроорганізмів.

Далі мікроорганізми розкладають нафту та нафтопродукти на безпечні речовини, кінцевим продуктом яких є вуглекислий газ і вода. При цьому мікроорганізми на фракціях носія з малою питомою вагою (торф і подрібнені сухі водорості) сорбують і переробляють вуглеводні нафти з поверхні водного середовища, а мікроорганізми з важкими фракціями (подрібнені стулки мідій, пісок), що поступово опускаються на дно, сорбують і забезпечують деструкцію вуглеводнів нафти та

нафтопродуктів у товщі водного середовища і на дні водоймищ.

Дослідженнями було встановлено, що при вмісті у біопрепараті біофлорів консорціуму штамів у перерахунку на бактеріальні клітини менше  $10^6$  в 1 г препарату його сорбційна та деструктивна активність відносно вуглеводнів нафти різко знижується, вміст біофлорів консорціуму штамів у перерахунку на бактеріальні клітини більше  $10^9$  в 1 г препарату не доцільний, тому що активність препарату істотно не збільшується. Оптимальним є вміст біофлорів консорціуму штамів у перерахунку на бактеріальні клітини  $10^7$ - $10^8$  в 1 г препарату, що забезпечує максимальні сорбційні та деструктивні властивості.

Слід зазначити, що великою цінністю запропонованого біопрепарату є те, що з мільйонів відомих мікроорганізмів у ньому зазначені саме ті з них, що здатні цілком розкласти нафту та нафтопродукти. Бактерії-деструктори вуглеводнів нафти і нафтопродуктів роду *Pseudomonas*: 2АВ<sub>1</sub>х, ТВНх, І-17<sub>(1)</sub>х, І-17<sub>(2)</sub>х, не є патогенними для людини і тварин, не мають антагоністичних властивостей один щодо одного і є антагоністами патогенних бактерій, що забруднюють навколишнє середовище.

Дослідженнями встановлено, що при введенні у забруднене нафтою середовище консорціуму бактерій-деструкторів меншого складу ніж у запропонованому біопрепараті позитивний ефект істотно знижується. Це пояснюється тим, що різні види мікроорганізмів з різною швидкістю переробляють нафту та нафтопродукти у залежності від різних умов середовища: температури, кислотності, хімічного складу ґрунту й інших параметрів, а головне від хімічного складу нафти та нафтопродуктів: присутності в них як легких так і важких фракцій вуглеводнів.

Приклади здійснення запропонованого способу.

#### Приклад № 1.

Здійснювали очищення води від плівки нафтопродуктів (дизельне паливо) в акваторії порту, де на поверхні води була плівка нафтопродуктів товщиною 2 мм площею 70 кв. м.

Згідно з заявленим способом розпоршували запропонований біопрепарат над всією забрудненою площею, при вмісті понад 10 мільйонів клітин мікроорганізмів у 1 г носія. Було розпилено 5 кг біопрепарату. Як носій використовувалася суміш з таких компонентів, % мас.:

торф	70
подрібнені стулки мідій (фракція 10-15 мм)	10
пісок морський	10
подрібнені водорості	10.
Використовувались стулки мідій: <i>Mytilus galloprovincialis</i> , водорості: <i>Ceramium rubrum</i> , <i>Ulva rigida</i> .	

Розпилення проводилося ввечері о 19 годині. Наступного дня о 8 годині ранку плівки нафтопро-

дуктів на поверхні води виявлено не було. В пробах води взятих з різних глибин нафтопродуктів також не було виявлено.

#### Приклад 2.

Здійснювали очищення басейну-відстійника на очисних спорудах станції з промивання залізничних нафтоналивних цистерн. Басейн був заповнений промивною водою з емульгованими нафтопродуктами, на дні басейну знаходилось близько 20 кг важких фракцій нафти.

Згідно з заявленим способом над поверхню басейну розпоршували запропонований біопрепарат іммобілізований на такому ж носії, як в прикладі 1, при вмісті понад 10 мільйонів клітин мікроорганізмів в 1 г носія. Було розпилено 6 кг біопрепарату. Розпилення проводилось о 19 годині. Наступного дня о 8 годині ранку в більшій частині шару води нафтопродуктів виявлено не було (емульговані у воді нафтопродукти спостерігались лише в придонній частині басейну). Через 10 діб аналіз осаду з дна басейну показав, що 83 % нафти засвоєно мікроорганізмами.

#### Приклад 3.

До забрудненого нафтопродуктами (дизельне паливо, мастильні матеріали) шару ґрунту глибиною до 20 см на о. Змішаний додавали сорбенти: сіно (250 г/м<sup>2</sup>), солому (250 г/м<sup>2</sup>), пісок (2 кг/м<sup>2</sup>) і запропонований біопрепарат (500 г/м<sup>2</sup>), іммобілізований на носії, який містив такі складові, % мас.:

торф	75
сіно	10
солома	8
природні мінерали	7.

Здійснювали перемішування забрудненого ґрунту з сорбентами і мікроорганізмами, після чого забруднену поверхню ґрунту обробляли рідкою культурою біопрепарату із розрахунку 1 л/м<sup>2</sup> і засівали овес.

Додаткове зволоження ґрунту не здійснювали, оскільки зрошення проходило природним шляхом з метеопадами.

Через сорок діб була здійснена сидерація. Овес, що зростав на обробленій ділянці був скошений, подрібнений і змішаний з ґрунтом. Ще через 20 діб візуальне обстеження забрудненої ділянки ґрунту виявило відновлення рослинного покриву - рослини ячменю (*Avena sativa* L.) та свинорю (*Cynodon dactylon*), що здатні вкорінюватися. Покриття ділянки рослинами склало 80 %. Проведений біологічний і хімічний аналіз ґрунту показав зниження кількості нафтопродуктів у ґрунті на 89,66 %.

У такий спосіб запропонований біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів нафти має істотні переваги над досягнутим рівнем технологій у розглянутій галузі, є новим і здатним при правильному застосуванні дати позитивний ефект для поліпшення екологічної ситуації в місцях виробництва і використання нафти та нафтопродуктів.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresour. Technol.

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)



## Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514



Sunita J. Varjani<sup>a,b</sup>, Vivek N. Upasani<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Biological Sciences and Biotechnology, Indian Institute of Advanced Research, Gandhinagar 382007, Gujarat, India

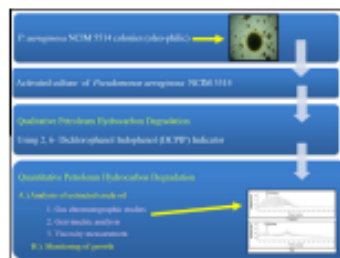
<sup>b</sup> Biotechnology Department, Kadi Sarva Vishwavidyalaya, Sector -15, Gandhinagar 382015, Gujarat, India

<sup>c</sup> Department of Microbiology, M.G. Science Institute, Ahmedabad 380009, Gujarat, India

### HIGHLIGHTS

- *P. aeruginosa* NCIM 5514 completely decolorized 2,6-dichlorophenol indophenol.
- Oil droplets in the vicinity of the colonies showed oleophilic nature.
- This isolate degraded C8–C36+ (60.63%) of crude oil based on GC analysis.
- First report on the use of 3% v/v crude oil as sole carbon source by an individual strain.
- Paraffin(s) degradation ability demonstrates its potential for removal of well clogging.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 September 2016  
 Received in revised form 29 September 2016  
 Accepted 1 October 2016  
 Available online 3 October 2016

#### Keywords:

Biodegradation  
 2,6-Dichlorophenol indophenol (DCPIP)  
 Gas chromatography  
 Petroleum hydrocarbons  
*P. aeruginosa* NCIM 5514

### ABSTRACT

The aim of this work was to study the potential of an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514, isolated from petroleum-polluted soil, for the biodegradation of crude petroleum oil. The isolate completely decolorized 2,6-dichlorophenol indophenol in 120 h when grown at (37 ± 1 °C), indicating its hydrocarbon utilizing nature. *Ex situ* biodegradation study was performed to find out quantitative utilization and biodegradation of paraffin(s) present in crude oil. When the culture was grown in Bushnell-Hass medium containing crude oil (3%, v/v) at 37 °C, 180 rpm for 60 days, the viscosity of the oil was reduced from 1883 cp to 1002 cp. Gravimetric and gas chromatographic analysis showed 61.03% and 60.63% of biodegradation of C8–C36+ hydrocarbons, respectively. These results indicated that the isolate has potential to be used for *ex-situ* and *in-situ* bioremediation of hydrocarbon pollutants and could have promising applications in petrochemical industry.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Petroleum industry is one of the most important among industrial sectors in India. The carcinogenic, mutagenic, neurotoxic and immunotoxic pollutants of petroleum products through spill(s) and leakages pose serious threat to ecosystem and living beings

(Atlas, 1981; Tiwari et al., 2016). Green processes through microbes have caught attention for cleanup of pollutants by bioremediation of petroleum contaminated sites as well as for enhanced recovery of petroleum crude from reservoirs (Lal and Khanna, 1996; Batista et al., 2006; Sajna et al., 2015; Varjani and Upasani, 2016). Bioremediation technologies for pollutant removal are preferred over traditional physico-chemical techniques as they are economically cheaper and eco-friendly (Balba et al., 1998; Das and Mukherjee, 2007). Tanti and Buragohain (2013), have reported

\* Corresponding author.

E-mail address: [vnv\\_balophiles@yahoo.com](mailto:vnv_balophiles@yahoo.com) (V.N. Upasani).

microbial degradation as ultimate natural mechanism for cleanup of petroleum pollutants from environment. Significant role of native microbial flora has been reported in biodegradation/bioremediation processes (Goswami and Singh, 1991; Das and Mukherjee, 2007; Varjani and Upasani, 2012). Diverse group of bacteria, fungi, cyanobacteria and algae are involved in hydrocarbon degradation (Chaillan et al., 2004; Matsui et al., 2013; Tiwari et al., 2016). They are widely distributed in marine, freshwater and soil habitats (Batista et al., 2006). Bacteria are the most active agents in petroleum degradation (enzymatic) and microbial enhanced oil recovery (MEOR) through production of biosurfactants. Such products have shown commercial importance (Banat, 1995; Nalini and Parthasarathi, 2013; Varjani et al., 2015; Tiwari et al., 2016; Zhao et al., 2016). Varjani and Upasani (2016), have reported application of biosurfactant (rhamnolipid) produced by hydrocarbon degrading *Pseudomonas* sp. in MEOR through *ex-situ* bioaugmentation.

Bioremediation by biodegradation is considered as one of the primary mechanisms for elimination of hydrocarbon pollutants from the environment (Leahy and Colwell, 1990; Tanti and Buragohain, 2013). The presence of particular enzyme in microorganisms can be detected by incorporating a specific substrate in medium (if necessary) and then detecting products formed or even by checking disappearance of substrates from medium (Goswami and Singh, 1991; Bidoia et al., 2010). Among the different techniques for screening of hydrocarbon utilizing/degrading bacteria reported by various researchers, a colorimetric method has been found to be quite easy and reliable (Hanson et al., 1993; Bidoia et al., 2010; Varjani and Upasani, 2013).

Bioremediation efficacy can be measured by disappearance of individual hydrocarbons and/or total hydrocarbons (Mittal and Singh, 2009; Varjani et al., 2015). Gas chromatography (GC) as well as gas chromatography-mass spectrophotometry (GC-MS) techniques can be used to see the degree of crude oil degradation by comparison of control and biologically treated crude petroleum oil (Malik and Ahmed, 2012; Cai et al., 2013). GC data provides distribution pattern of petroleum hydrocarbons, fingerprints of major petroleum crude oil components and information on biodegradation extent of spilled oil. Enrichment of peak for biodegradation indicators such as pristane, hopane and/or phytane as well as their comparison (nC17/pristane, nC18/phytane, pristane/phytane) can also be used to monitor effect of microbial degradation on loss of petroleum hydrocarbons pollutants (Cai et al., 2013; Matsui et al., 2013; Varjani et al., 2015). The present study explored the potential of an indigenous *P. aeruginosa* NCIM 5514 strain for the bioremediation of petroleum hydrocarbon pollutants.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Soil and crude oil samples

Samples were collected from the Oil and Natural Gas Corporation (ONGC) oil fields, Gujarat, India as described earlier (Varjani, 2014). Crude oil polluted subsurface soil sample was collected from Central Tank Farm (CTF) of Ankleshwar Asset, whereas Crude oil sample was collected from ONGC oil well (K#X), Gujarat, India. Sampling procedure and physico-chemical properties of crude oil have been reported earlier (Varjani et al., 2013; Varjani and Upasani, 2016).

### 2.2. Microbial culture and inoculum preparation

A strain of *P. aeruginosa* NCIM 5514 was used in the present study, which was preserved in 20% v/v sterile glycerol solution at  $-70^{\circ}\text{C}$ . For routine experiments the isolate was maintained on

nutrient agar slant at  $4^{\circ}\text{C}$  in a refrigerator and sub-cultured at an interval of 30 days. Bacterial isolate was activated by transferring culture from nutrient agar slants into Bushnell-Hass (BH) medium, supplemented with 1% v/v crude oil and incubated at  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  at 180 rpm for 24 h. Inoculum was prepared in 50 ml BH medium, supplemented with crude oil (K#X, 1% v/v) by inoculating the activated culture broth (1% v/v, optical density 1.0 at  $\text{AU}_{600}$ ) and incubated at  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 180 rpm for 24 h.

### 2.3. Morphological characterization

Morphological characteristics were studied by performing Gram staining of pure culture suspension of the isolate. Cultural characteristics were recorded from growth on nutrient agar plate. Pictures of colonies were taken at 40X magnification using Lynx LM-52 Trinocular microscope using Nikon P6000 camera (Varjani and Upasani, 2012). Detailed molecular identification of *P. aeruginosa* NCIM 5514 is described elsewhere (Varjani et al., 2014a).

### 2.4. Crude oil utilization using 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) indicator

Bacterial culture suspension (having optical density 1.0 at  $\text{AU}_{600}$ ) was prepared from the activated culture of *P. aeruginosa* NCIM 5514. This culture suspension was inoculated into microtiter plate along with DCPIP indicator (0.5%, w/v) and the crude oil (K#X) for spectrophotometric analysis to check decolorization (Bidoia et al., 2010). Appropriate controls and substrate/crude oil assays were included as mentioned in Table 1. Color change of DCPIP was observed visually at interval of 24 h till 120 h, and absorbance in terms of optical density was measured spectrophotometrically by Hach® DR 2500 spectrophotometer at  $\text{AU}_{600}$ . Decoloration of DCPIP is directly proportional to the hydrocarbons utilization from crude oil by the isolate (Varjani et al., 2013; Varjani and Upasani, 2013).

### 2.5. Biodegradation studies

#### 2.5.1. Biodegradation of crude oil (K#X)

Biodegradation assay was carried out in twelve 1 L Erlenmeyer flasks containing 500 ml Bushnell-Hass medium. Sterile crude oil from well K#X (3% v/v) was added in each flask as the sole source of carbon and energy. Inoculum (2% v/v, 24 h old culture) of *P. aeruginosa* NCIM 5514 (optical density 1.0 at  $\text{AU}_{600}$ ) was added in set of six test flasks; other six flasks were kept as control i.e., without inoculum. One control and one test flask, each were harvested at 12 days intervals for crude oil extraction and analysis (Varjani et al., 2015). The collected samples were extracted and analyzed to check total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation by gas chromatography. Un-inoculated control flasks were considered as control for abiotic losses. Growth was monitored by gravimetric method after every 12th day. Statistical analysis of the results was performed using SPSS 16.0. All analyses were per-

**Table 1**  
Protocol for petroleum hydrocarbon(s) utilization by a colorimetric assay using DCPIP indicator.

Assay	DCPIP ( $\mu\text{l}$ )	BHM (ml)	Culture ( $\mu\text{l}$ )	Crude oil ( $\mu\text{l}$ )
ISC	2000	7.5	–	–
SC	2000	7.5	1000	–
Control	2000	7.5	–	300
Test	2000	7.5	1000	300

ISC: Inoculum and substrate control, SC: Substrate control, Control: Organism control, Test: Organism test; BHM: Bushnell-Hass medium, DCPIP: 2,6-dichlorophenol indophenol

formed in three sets and results are represented as mean  $\pm$  standard deviation (s.d.).

### 2.5.2. Extraction of residual crude oil

Extraction of residual crude oil was carried out as per the method described by Varjani et al. (2015). In brief, at 12 days intervals, bacterial activities were stopped by adding 1% v/v 1N HCl to the flasks. Crude oil culture broth was mixed with equal volume of petroleum ether: acetone (1:1, v/v) in a separating funnel and was shaken vigorously to get a single emulsified layer. Acetone was then added and shaken gently to break the emulsification, which resulted in three layers. Top layer containing petroleum ether mixed with crude oil and acetone was taken out in a beaker. The extracted oil was passed through anhydrous sodium sulphate to remove the moisture. Petroleum ether and acetone were evaporated by heating in a water bath.

### 2.5.3. Analysis of extracted crude oil

**2.5.3.1. Viscosity measurement and gravimetric analysis.** The extracted crude oil was analysed using viscosity measurement (She et al., 2011), and gravimetric analysis (Varjani et al., 2015; Varjani and Upasani, 2016). The gravimetric estimation of residual oil left after biodegradation was done by weighing the quantity of oil.

**2.5.3.2. Gas chromatography (GC).** Extracted crude oil samples, both control and biodegraded were further fractionated for finger printing, i.e., gross and molecular composition by gas chromatographic procedure earlier described (Varjani et al., 2015). GC analysis was carried out on Perkin Elmer Clarus 500 GC (ASTM D7169), equipped with flame ionization detector (FID). Crude oil components were separated on a 6-m long DMPS capillary column (internal diameter, 0.53 mm; film thickness, 0.15  $\mu$ m). The instrument calibration was checked by running ASTM D2887. Reference gas oil (RGO) sample for weight percent was recovered as per the boiling point distribution. Inlet initial temperature and final temperatures were 45 °C (2.0 min) and 430 °C, respectively. The inlet temperature program was 70 °C/min. Oven initial and final temperatures were 35 °C (2.90 min) and 400 °C, respectively. The oven temperature program and final hold time was 10 °C/min and 15 min, respectively. Helium was used as a carrier gas. Detector temperature was 430 °C. Hydrogen gas flow rate and air flow rate was 45 and 450 ml/min, respectively. The column flow and initial hold time was 2/12 ml/min and 2.0 min, respectively. Sample (0.2  $\mu$ l) of respective crude oil, viz., control and test at concentration 2.0% v/v were used during this study. Total run time was 53.3 min. Various intermediate metabolites were identified by matching the retention times with authentic standards. The biodegradation efficiency (%) was calculated as follows:

$$\text{Biodegradation efficiency(\%)} = 100 - (As \times 100/Aac)$$

where, As = total area of peaks in each test sample, Aac = total area of peaks in the appropriate abiotic control (Dussán and Mónica, 2012; Varjani et al., 2015).

## 3. Results and discussion

The bacterial strain *P. aeruginosa* NCIM 5514 was isolated from petroleum polluted subsurface soil samples of ONGC's central tank farm (CTF) of Ankleshwar asset, India. As reported earlier, soil and crude oil samples were used in this study showed 19.57 and 43.75% hydrocarbon utilizing bacterial count and total viable count, respectively (Varjani et al., 2013). Screening of hydrocarbon utilizing bacteria was performed using 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) – a redox indicator (Varjani et al., 2013;

Varjani and Upasani, 2013). When hydrocarbon degrading *P. aeruginosa* NCIM 5514 was grown on BH medium supplemented with 1% w/v glucose for 96 h days at 37  $\pm$  1 °C at 180 rpm, emulsification activity and surface tension value for cell-free supernatant was 69.73  $\pm$  0.53% and 28.59  $\pm$  0.50 mN/m, respectively (Varjani et al., 2014a). This strain with GenBank accession number KC713611 for 16S rDNA sequence showed 99.46% homology with *P. aeruginosa* LMG 1242 (Varjani et al., 2015).

Reports are available for studies on aerobic as well as anaerobic microorganisms, either individual or as consortium from petroleum oil-field samples, viz., injection water, drilling solution, by natural flow of subsurface water and subsurface soil (Nazina et al., 2005; Tanti and Buragohain, 2013; Manif et al., 2014; Varjani et al., 2014b; Varjani et al., 2015; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016). Since, the bacterium used in this study was isolated from the subsurface soil sample, its physiology apparently corresponded to moderate environment.

### 3.1. Morphological characterization

The isolate was a gram-negative, short rod and motile bacterium. Colonies on nutrient agar plate were medium, irregular, flat, auriculate, smooth, translucent and produced diffusible fluorescent yellow-green pigment. Colony photograph (40X) of *P. aeruginosa* NCIM 5514 on BH agar plate with crude oil (1% w/v, K#X) as shown in Fig. S1 demonstrates the presence of oil droplets in vicinity, which indicated oleophilic nature of the isolate.

### 3.2. Utilization of crude oil (K#X)

The efficiency of this isolate to degrade / utilize crude oil (as a sole carbon source) is exhibited by complete decolorization of DCPIP in 120 h at 37  $\pm$  1 °C (Fig. 1). Inoculum and substrate control assay did not show discoloration, whereas organism control and organism test assay showed remarkable discoloration (in terms of oil utilization). It was interesting to note that organism test assay completely decolorized DCPIP and demonstrated more rapid utilization of crude oil hydrocarbon(s) as compared to organism control assay. Even though no inoculum was added, crude oil hydrocarbon(s) utilization occurred in organism control assay probably due to indigenous microbial flora in oil sample. Inoculum and substrate control assays indicated there was no reaction between BH medium ingredients and DCPIP. Substrate control assay indicated DCPIP and BH medium together did not hamper the growth of the isolate. Hence, inoculum and substrate control assays showed small or negligible decrease in DCPIP concentration which indicated an overall pattern of natural disintegration of DCPIP chemical structure over time. Therefore, it could not be due to inoculum added in respective assay well. Organism control as well as organism test assays revealed decrease in DCPIP color, indicating the utilization of crude oil by the isolate. Organism test assay showed rapid decrease in DCPIP absorbance as compared to organism control assay (Fig. 1). DCPIP concentration below 0.030 g/l can be considered as complete discoloration as recommended by Bidoia et al. (2010).

Oleophilic microbes are used in biodegradation to remove hydrocarbon pollutants from the environment (Macaulay and Rees, 2014). Colorimetric method to screen hydrocarbon utilizing/degrading bacteria using DCPIP – a pH dependent redox indicator is considered a useful tool (Hanson et al., 1993). This indicator was blue when oxidized and colorless when reduced (monitored at 600 nm). As microorganisms utilize hydrocarbons present in the crude oil, DCPIP is reduced and as time progresses after inoculation DCPIP becomes colorless (Bidoia et al., 2010; Varjani and Upasani, 2013). *B. subtilis* culture has been reported to completely reduce

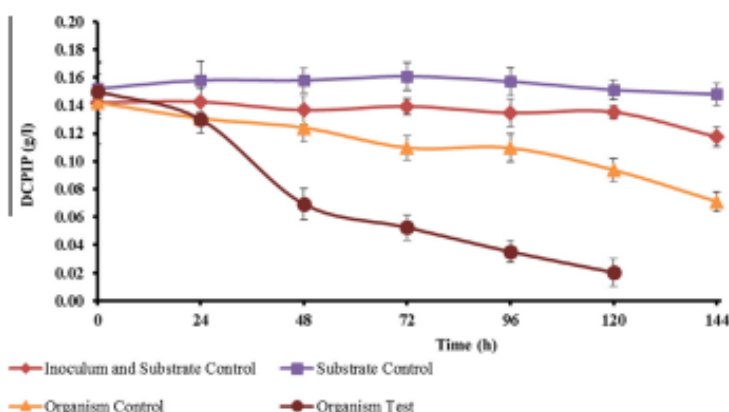


Fig. 1. DCPIP concentration quantified at 600 nm for *P. aeruginosa* NCIM 5514 (mean of three replicates; error bars represent s.d.).

DCPIP at 138, 125, 75 and 87 h for synthetic, semi-synthetic, mineral and used oil, respectively (Bidoia et al. (2010).

### 3.3. Degradation crude oil (K#X)

*P. aeruginosa* NCIM 5514 reduced the viscosity of crude oil from 1885.023 cp to 1002.065 cp in 60 days (Fig. 2). Viscosity reduction indicated changes in flow behaviour of crude oil. Gravimetric analysis showed 61.03% crude oil degradation (Fig. 2). Gas chromatogram of control and test samples of crude oil (K#X) at 60 days are shown in Fig. S2. Fingerprinting of control and degraded crude oil samples by gas chromatograms showed that the isolate degraded major components of crude oil completely, which was observed by the enrichment of biomarker (pristane) peak (Fig. S2). Total petroleum hydrocarbon (TPH) profile in the control and test flasks is presented in Tables 2 and 3, respectively. At 60 days of incubation, the culture degraded 60.63% crude oil (Table 3). Lower alkanes C8–C11 were 100% depleted in 48 days (Table 3). These fractions were also removed in the control flasks (Table 2), i.e., without inoculum, indicating abiotic removal apparently under the influence of physical factors. When degradation was assayed and measured as removal through biotic fractions by subtracting percentage removal in the test (with inoculum)

from control (without inoculum), different rates of removal for different hydrocarbon components (C8–C36+) were observed. Among various components of crude oil (K#X), lowest biotic removal (0.60%) was noted for C36+. Highest biotic removal (97.80%) was observed for C20 hydrocarbons. The biotic removal for C15, C19–C21, C26 and C32 was in the range of 90–98%. However, hydrocarbon components C22, C29, C31 and C33 were removed biotically in range of 80–87% (Table 3). The isolate utilized crude oil (K#X) as a sole carbon and energy source, which was evident from increase in biomass of the isolate till 48th day of incubation, reaching maximal that ranged from 0.0122 to 3.8641 g/l, whereas it decreased to 3.5893 g/l at 60th day. The control flask also showed the presence of turbidity/biomass, which was due to abiotic factors viz. agitation, temperature, Bushnell-Hass medium, pH etc. (Fig. S3).

Biodegradation study of crude oil by *P. aeruginosa* NCIM 5514 was conducted at mesophilic conditions ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) to ensure its ability to degrade total petroleum hydrocarbons and its various fractions at an average outdoor temperature of soil. To date, the optimum concentration of crude oil as a sole carbon source for the growth of individual isolate/consortium reported has been 2.0%, v/v above which it has been toxic, hampering the growth of microorganisms (Varjani et al., 2014b, 2015). This is the first report for 3.0%, v/v crude oil being used for growth and biodegradation by an individual isolate. As reported earlier, this culture was halo-tolerant growing in the medium containing up to 5.0%, w/v NaCl (Varjani, 2014), indicating its application in oil spill management in the oceans.

Survival and growth of microbes in medium supplemented with petroleum hydrocarbons after their inoculation is a key-deciding factor for the rate of their biodegradation (Sugiura et al., 1997; Das and Mukherjee, 2007). The isolate reported here survived and adopted the crude oil contaminated environment very easily. This was evident from the significant increase in growth in the test flasks as compared to control flasks (Fig. S3).

Phan et al. (2013), reported  $75.2 \pm 0.6\%$  total petroleum hydrocarbon degradation of Tapis crude oil by biosurfactant producing *P. aeruginosa* UKMP-14T in seven days at  $40^\circ\text{C}$ , 150 rpm. Sugiura et al. (1997), reported that n-alkanes (C14–C30) were preferentially degraded as compared to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Pseudomonas* sp. This could be due to (a) availability of crude oil hydrocarbon compounds subjected to biodegradation, (b) adaption of microorganisms to an environment contaminated with crude oil, and (c) presence of enzymes, which contribute to various pathways for degradation (Tiwari et al., 2016). Sugiura

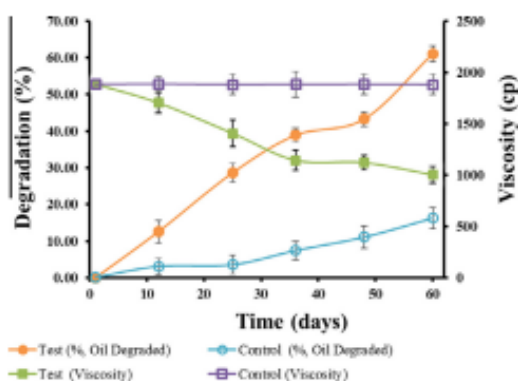


Fig. 2. Gravimetric analysis and viscosity measurement of control and *P. aeruginosa* NCIM 5514 treated crude oil (mean of three replicates; error bars represent s.d.).

et al. (1997), performed biodegradation studies on four crude oil samples, viz., Arabian light, Dubai, Maya, and Shengli by *Acinetobacter* sp. T4 and microbial consortium SM8. They found that consortium showed better degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons than *Acinetobacter* sp. (which was not able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons). They concluded that higher API gravity oil was more susceptible to biodegradation.

Cai et al. (2013), investigated aerobic biodegradation of crude oil and proposed its pathways through *in vitro* culture and GC-MS analysis in water flooding wells of Dagang oil field, China. They reported survival of *in vitro* aerobic culture for 90 days with 99.0% n-alkanes, and removed 43.03–99.9% polycyclic aromatic hydrocarbons. On the basis of biomarkers and their ratios, degradation of alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons as well as generation of metabolites, they proposed pathways of alkanes and aromatics degradation/utilization, which showed the oxidation of hydrocarbons to organic acid, which was an important process in aerobic biodegradation of petroleum. They suggested that oxygen in water flooding activated aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons by the indigenous microorganisms and caused changes in aromatic fraction and few biomarker ratios. They concluded that indigenous microorganisms degraded oil under aerobic condition and could be applied in oil spill bioremediation. Recently Varjani et al. (2015), have reported 83.70% of crude oil (C8–C35) removal by halotolerant hydrocarbon utilizing bacterial consortium (HUBC) obtained from on-shore sites. They also suggested the use of HUBC for the biodegradation of paraffin/wax as well as in sea surface oil spill management.

#### 4. Conclusion

Present study explored the potential of an indigenous strain of *P. aeruginosa* NCIM 5514 for biodegradation of crude oil. Complete decolorization of DPIP by this isolate indicated its hydrocarbon utilizing/degrading nature. From the results on utilization/degradation of C8–C36+ components of crude oil, it was concluded that the isolate could be used to solve pollution problems during oil exploration processes and transportation. Hydrocarbon degrading properties of this organism further suggested its application for *in situ* bioremediation of petroleum hydrocarbon polluted sites as well as management of oil spills either terrestrial or marine.

#### Acknowledgements

Authors are grateful to authorities of M.G. Science Institute for providing lab facilities and equipments under the DBT Star College Scheme; and Indian Institute of Advanced Research (IIAR), Gandhinagar for the same. We are also thankful to scientists at Institute of Reservoir Studies (IRS), ONGC, Ahmedabad, for their invaluable suggestions. The help for sample collection by Vipin Kukreti and Rajendrakumar Nimesh, ONGC, Gujarat is also acknowledged. Research inputs provided by late Mahesh C. Sharma, Biotechnology Department, Kadi Sarva Vishwavidyalaya, Gandhinagar, is gratefully appreciated.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>.

#### References

ASTM D2887-16. Standard Test Method for Boiling Range Distribution of Petroleum Fractions by Gas Chromatography <<http://www.astm.org/Standards/D2887>> (last accessed 27.08.16).

- ASTM D7169-11. Standard Test Method for Boiling Point Distribution of Samples with Residues Such as Crude Oils and Atmospheric and Vacuum Residues by High Temperature Gas Chromatography <<http://www.astm.org/Standards/D7169>> (last accessed 27.08.16).
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45 (1), 180–209.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods* 32, 155–164.
- Banat, I.M., 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresour. Technol.* 51, 1–12.
- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., Totola, M.R., 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 97, 868–875.
- Bidoia, E.D., Montagnoli, R.N., Lopes, P.R.M., 2010. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Publishing, Spain, pp. 1277–1288.
- Cai, M., Yao, J., Yang, H., Wang, R., Masakorala, K., 2013. Aerobic biodegradation process of petroleum and pathway of main compounds in water flooding well of Dagang oil field. *Bioresour. Technol.* 144, 100–106.
- Chaillan, F., LeFleche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading organisms. *Res. Microbiol.* 155 (7), 587–595.
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* 98 (7), 1339–1345.
- Dussán, J., Mónica, N.M., 2012. Degradation of diesel, a component of the explosive ANFO, by bacteria selected from an open cast coal mine in La Guajira, Colombia. *J. Bioprocess. Biotech.* 2 (4), 126–131.
- Goswami, P., Singh, H.D., 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1), 1–11.
- Hanson, K.G., Desai, J.D., Desai, A.J., 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.* 7 (10), 745–748.
- Lal, B., Khanna, S., 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes edwardsii*. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 355–362.
- Leahy, J.H., Cotwell, R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54 (3), 305–315.
- Macaulay, B.M., Rees, D., 2014. Bioremediation of oil spills: a review of challenges for research advancement. *Ann. Environ. Sci.* 8, 9–37.
- Malik, Z.A., Ahmed, S., 2012. Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *Afr. J. Biotechnol.* 11 (3), 650–658.
- Manit, S., Sayadi, S., Chamkha, M., 2014. Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 86, 258–264.
- Matsui, T., Yamamoto, T., Shinzato, N., Mitsuta, T., Nakano, K., Namihira, T., 2013. Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria. *Ann. Microbiol.* (101007/s13213-013-0643-8).
- Meckenstock, R.J., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J.S., Tarouco, P.C., Weyrauch, P., Dong, X., Himmelberg, A.M., 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 26, 92–118.
- Mittal, A., Singh, P., 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 760–765.
- Nalini, S., Parthasarathi, R., 2013. Biosurfactant production by *Serratia rubidra* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresour. Technol.* 147, 619–622.
- Nazina, T.N., Sokolova, D.S., Grigoryan, A.A., Shestakova, N.M., Mikhailova, E.M., Poltaraus, A.B., Tourouva, T.P., Lysenko, A.M., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., 2005. *Geobacillus jurasicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 43–53.
- Phan, C.W., Bakar, N.F.A., Hamzah, A., 2013. Comparative study on biosurfactant activity of crude oil-degrading bacteria and its correlation to total petroleum hydrocarbon degradation. *Bioremed. J.* 17, 240–251.
- Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D., Pandey, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresour. Technol.* 191, 133–139.
- She, Y.H., Zhang, F., Xia, J.J., Kong, S.Q., Wang, Z.L., Shu, F.C., Hu, J.M., 2011. Investigation of biosurfactant-producing indigenous microorganisms that enhance residue oil recovery in an oil reservoir after polymer flooding. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 223–234.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S., 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31, 45–51.
- Tanti, B., Buragohain, A.K., 2013. Biodegradation of petroleum tar by *Pseudomonas* spp. from oil field of Assam, India. *Bioremed. J.* 17 (2), 107–112.
- Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S., Tiwari, A., 2016. Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresour. Technol.* 216, 1102–1105.
- Varjani, S.J., 2014. Hydrocarbon degrading and biosurfactants (bioemulsifiers) producing bacteria from petroleum oil wells (Ph.D. thesis). Kadi Sarva Vishwavidyalaya, Ahmedabad, Gujarat, India.