

Синтез мікробних поверхнево-активних речовин для очищення довкілля від нафти та нафтових забруднень**Вступ**

На теперішній час для очищення води і ґрунту від нафтових забруднень перевагу віддають біологічним методам. Використання поверхнево-активних речовин (ПАР, біосурфактанти) або нафтоокиснювальних мікроорганізмів є одним з найперспективніших методів очищення систем від вуглеводнів. Механізм дії поверхнево-активних речовин полягає в десорбції та солюбілізації вуглеводнів, а також у стимуляції активності мікроорганізмів-деструкторів нафти [5, 2].

Так, поверхнево-активні міколати *Rhodococcus erythropolis* і *Nocardia erythropolis* використовуються для видалення нафти з піску та нафтових сланців [4].

Встановлено, що внесення біосурфактантів *Rhodococcus* у ґрунт супроводжується не тільки підвищенням ступеню деградації нафти, але й суттєвим збільшенням популяцій бактерій, які беруть участь в окисленні сирої нафти [3]. Під дією біосурфактантів бактерій роду *Rhodococcus* процес біологічного очищення прискорюється на 20-25%.

Найголовнішою перевагою мікробних ПАР є те, що вони не збільшують токсичність нафтопродуктів, а також частково емульгують нафту, чим підвищують її доступність для мікроорганізмів. Їх використання відзначається низькими експлуатаційними витратами, простим обслуговуванням, надійністю очищення, що зумовлює практично повну деградацію органічних сполук до оксидів вуглецю, азоту та ін. На противагу мікробним, використання хімічних ПАР завдає великої шкоди екосистемам та призводить до її повільного відновлення [1, 6]. Відомі такі варіанти використання мікробних ПАР у процесах очищення: використання мікроорганізмів-продуцентів ПАР для утилізації забруднюючих речовин; обробка забрудненої зони розчинами ПАР для солюбілізації вуглеводнів, що стимулює розвиток природної мікрофлори; очищення найбільш забруднених ділянок із застосуванням біореакторів, у яких здійснюється пряме очищення ґрунту розчинами ПАР.

**Синтез поверхнево-активних речовин
штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гідрофільних і гідрофобних субстратах**

Об'єктом наших досліджень був штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ізольований із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України під реєстраційним номером ІМВ Ас-5017.

Здатність до синтезу поверхнево-активних речовин оцінювали за такими показниками. Поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, який вимірювали за допомогою платинової або скляної пластинки за методом Вільгельмі. Умовна концентрація ПАР (ПАР*), яку визначали для експрес-оцінки кількісного вмісту поверхнево-активних речовин у культуральній рідині. Цей показник визначається як ступінь розведення вільної від клітин культуральної рідини у точці збільшення поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від значення розведень. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР та виражається в безрозмірних одиницях. Вміст загальних ліпідів (г/л) у культуральній рідині визначали ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча (хлороформ – метанол). Емульгувальну активність (E_{24}) визначали через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини у пробірці і виражали у процентах. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Якісний склад ліпідів визначали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). Аналіз проводили з використанням таких систем розчинників: неполярна система: гексан – діетиловий ефір (2:1); полярна система: хлороформ – метанол – вода (85:15:1). Ідентифікацію ліпідів здійснювали шляхом обробки пластинок спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і парами йоду (фосфоліпіди, загальні ліпіди), розчином нінгідрину (пептидоліпіди), анісовим альдегідом і антроновим реактивом (гліколіпіди).

Встановлена здатність до утворення поверхнево-активних речовин під час росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гідрофільних (етанол, глюкоза) та гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах. Встановлено, що штам синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами метаболіти з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями. За хімічною природою ПАР, синтезовані *R. erythropolis* ЕК-1, є комплексом гліколіпідів (трегалозомоно- і трегалозодикоріноміколати), фосфоліпідів (фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, дифосфатидилгліцерин) та загальних ліпідів (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти, тригліцерид, міколові кислоти).

Експерименти показали, що найнижчі значення поверхневого натягу (σ_s , 30-39 мН/м) та високі значення умовної концентрації ПАР (ПАР* 2,5-5,0) спостерігали при вирощуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофобних субстратах. На гідрофільних субстратах показник σ_s підвищувався до 50-55 мН/м, а ПАР* знижувався до 1,1-1,2.

Оскільки найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися при рості *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофобних субстратах, подальші наші дослідження були присвячені оптимізації синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані.

Найвищі показники синтезу ПАР спостерігались при вирощуванні бактерій на середовищах з 2 % гексадекану впродовж 168 год. Слід зазначити, що максимальна кількість ПАР накопичувалася при 3 % гексадекану, однак при цьому знижувався їх вихід по відношенню до заданого субстрату. Оптимальним для синтезу ПАР штамом *R. erythropolis* ЕК-1 є співвідношення вуглець/азот, яке становить 49:1.

Встановлено, що заміна нітрату калію у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію супроводжувалась підвищенням показників синтезу поверхнево-активних речовин. На сьогоднішній день механізм позитивного впливу іонів натрію на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 залишається невідомим. Ми вважаємо, що Na^+ можуть бути активатором ферментів, які беруть участь у синтезі ПАР, або ці катіони необхідні для забезпечення транспорту субстрату у клітини.

При внесенні у середовище іонів заліза спостерігалась інтенсифікація синтезу ПАР, що може свідчити про функціонування у *R. erythropolis* ЕК-1 алкангідроксилазного ферментного комплексу, який містить залізосіркопротеїд рубредоксин.

Першою реакцією катаболізму вуглеводнів є їх окиснення до відповідних спиртів за участю кисню під дією ферментів монооксигеназ. У зв'язку з цим рівень аерації (масообміну) є важливим фактором, який впливає на утворення ПАР при рості продуцента на гексадекані. Встановлено, що для максимального накопичення поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 коефіцієнт масопереносу (K_s) повинен бути не нижчим за 0,11 г O_2 / л год.

Оптимальною температурою для росту *R. erythropolis* ЕК-1 є 30 °С, проте максимальний синтез ПАР спостерігали при 20 °С.

Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 в оптимальних умовах (концентрація гексадекану 2 %, співвідношення C/N = 49:1, джерело азоту NaNO_3 , наявність іонів заліза у середовищі, коефіцієнт масообміну 0,14 г O_2 / л год, температура 20 °С, тривалість культивування 168 год) дало змогу в 3-4 рази підвищити синтез ПАР: умовна концентрація ПАР становила 5,0-5,5, кількість синтезованих ПАР – 8,0-8,5 г/л; індекс емульгування розведеної у 50 разів культуральної рідини – 46-50 %, а величина поверхневого натягу знижувалась до 29,4-29,8 мН/м.

Використання нафтоокиснювальних бактерій і мікробних поверхнево-активних речовин для деградації нафтових забруднень

Одним із можливих шляхів очищення ґрунту і води від нафтопродуктів є активація окислювальної мікрофлори забруднених об'єктів. Велике значення має економічний аспект таких технологій, оскільки використання природних мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів суттєво знижує вартість процесів очищення.

Подальші дослідження були присвячені вивченню можливості інтенсифікації процесів деструкції нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів у присутності бактерій роду *Rhodococcus* та мікробних поверхнево-активних речовин, а також використанню нафтоокиснювальних бактерій для очищення води від нафти.

Для стимуляції процесів деструкції нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів використовували штами бактерій *Pseudomonas* sp. PS-27 і *R. erythropolis* ЕК-1, які є активними продуцентами поверхнево-активних речовин. Вибір *Pseudomonas* sp. PS-27 зумовлений здатністю цих бактерій рости на гідрофобних субстратах та синтезувати позаклітинні поверхнево-активні гліколіпіди (рамноліпіди) і полісахарид альгінатної природи [7].

Одержані результати показали, що ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27 інтенсифікували асиміляцію нафти досліджуваною накопичувальною культурою мікроорганізмів. Через 72 год вирощування цієї культури вміст залишкової нафти складав 24,1 %, тоді як у присутності *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27 вміст залишкової нафти знижувався до 19,5 % і 17,2 % відповідно. При збільшенні тривалості культивування до 192 год вміст залишкової нафти у присутності штаму *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27 знижувався відповідно до 10,0 % і 6,4 %, тоді як у контрольному варіанті знижувався лише до 15,8 %.

Таким чином, у результаті проведеної роботи показана можливість інтенсифікації процесу деградації нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів при введенні в неї активного штаму *R. erythropolis* ЕК-1, а також у присутності ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27.

Відомо, що ефективність очищення води від нафти і нафтопродуктів підвищується при іммобілізації мікроорганізмів. Досліджували здатність іммобілізованих клітин нафтоокиснювальних бактерій асимілювати різні вуглеводневі субстрати та визначали ступінь очищення забрудненою нафтою води іммобілізованими клітинами на модельній лабораторній установці.

Іммобілізацію клітин у модельній установці (рис. 1) здійснювали на подрібненому керамзиті (розмір частинок 2-3 мм). Колонку заповнювали керамзитом, промивали водопровідною водою і стерилізували при 121 °С упродовж 1 год. Подальшу роботу проводили у нестерильних умовах при кімнатній температурі (18-20 °С). Перед іммобілізацією клітин шар керамзиту насичували нафтою.

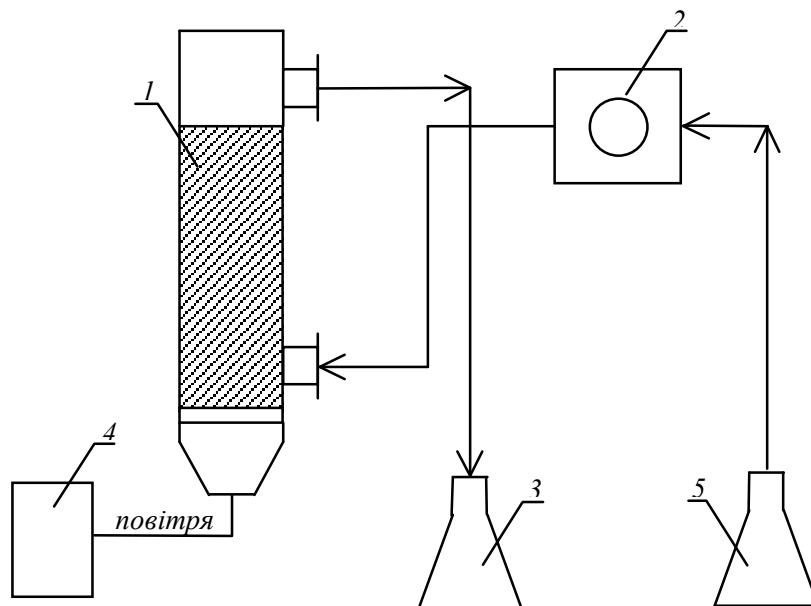


Рис. 1. Схема лабораторної установки для очищення забрудненою нафтою води іммобілізованими мікроорганізмами:
1 - колонка з керамзитом; 2 - перистальтичний насос; 3 - колба з водою, забрудненою нафтою;
4 - колба з очищеною водою; 5 - мікрокомпресор.

Встановлено, що використання керамзиту як носія для іммобілізації *R. erythropolis* ЕК-1 дало змогу інтенсифікувати процес росту і асиміляції вуглеводневих субстратів. Показана можливість очищення води, забрудненої нафтою (100-250 мг/л), іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 при високій швидкості подачі води (до 0,68 л/хв) і в умовах низької аерації (до 0,1 л повітря/л води за хв). Ступінь очищення води від нафти підвищувалась у

присутності біогенних добавок: при періодичному додаванні 0,01 % діамонійфосфату ефективність очищення становила 99,5 – 99,8 %.

Висновки

Поверхнево-активні речовини мікробного походження є ефективнішими, ніж синтетичні аналоги, а така їх перевага як біодеградабельність і нетоксичність роблять їх особливо перспективними для створення нових екологічно безпечних технологій для очищення довкілля, в нафтовидобувній, хімічній, харчовій промисловостях, а також у сільському господарстві.

Порівняно з відомими продуцентами мікробних поверхнево-активних речовин селекціонований нами штам *R. erythropolis* ЕК-1 має такі переваги: синтезує поверхнево-активні речовини на простому мінеральному середовищі з низьким вмістом солей – 3 г/л (для інших штамів – до 12 г/л); для синтезу ПАР може бути використаний широкий набір вуглецевих субстратів: гідрофільні (глюкоза, етанол) та гідрофобні (гексадекан, рідкі парафіни); не потребує додаткового внесення у середовище мікроелементів та факторів росту, а також попередників синтезу ПАР (цитрат натрію); характеризується вищим виходом ПАР від субстрату.

Одержані результати показують можливість розробки високоефективних технологій для очищення довкілля від нафтових забруднень з використанням поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1.

Література

1. Annweiler, E., H. H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, W. Francke, and W. Michaelis. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. Vol. 66. P. 518-523.
2. Bodour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils // Appl Environ Microbiol. 2003. Vol. 69. № 6 P. 3280-3287.
3. Calvo C., Toledo F.L. and González-López J.. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge // Biotechnology. 2004. Vol. 109. № 3 P. 255-262. 4
4. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // Environmental Pollution Rev. 2005 Vol. 133. № 2. P. 183-198.
5. Wei Q.F., Mather R.R., Fotheringham A.F.. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant // Bioresource Technology. 2005. Vol. 96. P. 331-334.
6. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M., McInerney M.J.. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms // Journal of Microbiological Methods. 2004. Vol. 56. № 3 P. 339-347.
7. Пат. 10467 UA, МПК С 21 N 1/02. Штам *Pseudomonas* sp. SP-17 – продуцент позаклітинних біоПАР і біополімеру / Шульга О.М., Карпенко О.В., Елісєєв С.А., Щеглова Р.А., Вільданова-Марцишин Р.І. - № 95041549; Заявл. 05.04.95; Опубл. 25.12.96, Бюл. № 4.

АНОТАЦІЯ

Із забруднених нафтою зразків ґрунту ізольовано штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Показана можливість синтезу поверхнево-активних речовин штамом під час росту на гідрофільних і гідрофобних субстратах. Встановлено умови культивування штаму на гексадекані, що дають змогу у 3-4 рази підвищити синтез поверхнево-активних речовин. Показана можливість інтенсифікації процесів деструкції нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів у присутності бактерій роду *Rhodococcus* і мікробних поверхнево-активних речовин. Встановлено, що ступінь очищення води, забрудненої нафтою (100-250 мг/л) іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 при високій швидкості подачі води (до 0,68 л/хв), низькій аерації (до 0,1 л повітря/л води за хв) та періодичній подачі 0,01 % діамонійфосфату становила 99,5 – 99,8 %.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, біосинтез, ліпіди, *Rhodococcus erythropolis*

АННОТАЦИЯ

Из загрязненных нефтью образцов почвы изолирован штамм нефтеокисляющих бактерий, идентифицированный как *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. Показана возможность синтеза поверхностно-активных веществ штаммом во время роста на гидрофильных и гидрофобных субстратах. Установлены условия культивирования штамма на гексадекане, которые позволяют в 3-4 раза повысить синтез поверхностно-активных веществ. Показана возможность интенсификации процессов деструкции нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов в присутствии бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ. Установлено, что степень очистки воды, загрязненной нефтью (100-250 мг/л), иммобилизованными на керамзите клетками *R. erythropolis* ЕК-1 при высокой скорости подаче воды (до 0,68 л/час), низкой аэрации (до 0,1 л воздуха/л воды в час) и периодической подаче 0,01 % диаммонийфосфата составляла 99,5 – 99,8 %.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, биосинтез, липиды, *Rhodococcus erythropolis*

The annotation

Oil oxidizing bacteria, identified as *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, was isolated from the samples of ground polluted by oil. The opportunity of synthesis of surface-active substances by culture during cultivation on hydrophilic and hydrophobic substratums was shown. Conditions of cultivation on hexadecane which allow to raise synthesis of surface-active substances in 3-4 times times were established. The possibility of an intensification of processes of oil destruction was shown by accumulating culture of oil oxidizing microorganisms at presence of bacteria of genus *Rhodococcus* and microbe surface-active substances. It was established that purification efficiency of water polluted by oil (100-250 mg/l) by immobilized (on haydite) cells *R. erythropolis* ЕК-1 at high speed of water transmission (up to 0,68 l/h), low aeration (up to 0,1 l air/l of water per hour) and periodic submission of 0,01 % diammonium phosphate was approximately 99,5 – 99,8 %.

Key words: surface-active compounds, biosynthesis, *Rhodococcus erythropolis*, lipids.