

УДК 759.873.088.5:661.185

Хом'як Д.І.

Боровик О.О.

Гриценко Н.А.

Конон А.Д.

Пирог Т.П., доктор біологічних наук

Національний університет харчових технологій

ВИКОРИСТАННЯ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ ДЛЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* K-8 ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ВПЛИВУ НА БІОДЕСТРУКЦІЮ НАФТИ

*В связи с накоплением больших количеств глицерина при производстве биодизеля возникает проблема его утилизации. Одним из вариантов является использование глицерина в качестве субстрата для микробного синтеза практически важных метаболитов, в частности поверхностно-активных веществ (ПАВ). Селекционирован штамм *Nocardia vaccinii* K-8 – продуцент ПАВ на глицерине. По химическому составу полученные ПАВ являются комплексом нейтральных, амино- и гликолипидов. Добавлением предшественников биосинтеза (цитрата и фумарата натрия) удалось повысить количество синтезированных ПАВ на 35%. Показана возможность использования препаратов ПАВ для очистки воды от нефтяных загрязнений. Степень деструкции нефти в воде (2,6 г/л) составила 98 % при обработке суспензией клеток *N. vaccinii* K-8 и 67 % - в присутствии препаратов ПАВ в виде супернатанта культуральной жидкости.*

*Due to the accumulation of large quantities of glycerol during the production of biodiesel raises problems of its utilization. One option is to use glycerol as a substrate for biosynthesis practically important compounds, such as biosurfactants. *Nocardia vaccinii* K-8 strain with the ability to product biosurfactants from glycerol was selected. By chemical composition derived surfactant present a complex of neutral, amino- and glycolipids. Adding predecessors of biosurfactants synthesis (sodium citrate and fumarate) managed to increase the number of synthesized surfactant by 35%. The ability of using biosurfactants to recuperate oil-polluted water was shown. The efficiency of water recuperation from oil (2,6 g/l) was 98% after the treatment with suspended cells and 67% after the treatment with biosurfactants preparation supernatant of cultural broth.*

Гліцерин – простий спирт (1,2,3-пропантріол), є одним з основних продуктів переестерифікації рослинних олій і тваринних жирів [1]. На теперішній час цей спирт у дуже великій кількості утворюється під час виробництва біодизелю як побічний продукт технології, і з кожним роком швидкість його накопичення зростає [1-3]. Існуючі споживачі гліцерину – парфумерна промисловість, військово-промисловий комплекс – не здатні забезпечити достатній рівень його утилізації [4]. Тому необхідним є пошук альтернативних шляхів вирішення цієї проблеми.

Перспективним підходом є використання гліцерину у біотехнологічній галузі як субстрату для культивування мікроорганізмів. При цьому можна отримувати досить широкий спектр продуктів залежно від продуцента та умов проведення процесу. Перевагами гліцерину перед традиційними вуглецевими субстратами (глюкоза, сахароза, крохмаль тощо) є низька вартість, доступність у великій кількості та вищий ступінь біодеградабельності. Це дає змогу отримувати прості сполуки (сукцинат, етанол, пропіонат, водень та ін.) з більшим виходом, ніж за використання вуглеводів. Крім цього, використання гліцерину у біотехнологічній промисловості може забезпечити утилізацію відходів біодизельних виробництв, що знизить навантаження на екосистему планети [3].

Процеси мікробного синтезу цільових продуктів з гліцерину зазвичай не потребують використання чистого спирту. Отже, можна використовувати відходи виробництва біодизелю без додаткової обробки, що дозволяє значно знизити вартість процесу та кінцевого продукту [6, 7].

Розглянемо детальніше метаболізм гліцерину в клітинах мікроорганізмів. Як і інші невеликі неполярні молекули, цей спирт проникає в клітину через цитоплазматичну мембрану шляхом пасивного транспорту. Тому за низьких концентрацій субстрату клітини з обмеженою здатністю до пасивного транспорту погано розвиваються. Метаболізм гліцерину часто згадується в літературі як єдиний приклад полегшеної дифузії через внутрішню мембрану у *Escherichia coli*. Полегшена дифузія забезпечується спеціальними мембранними білками-переносниками. Всередині клітини гліцерин відразу фосфорилується у гліцерин-3-фосфат за участю гліцеринкінази. Ця сполука залишається в клітині до подальшого включення у метаболізм. Існує два основні шляхи метаболізму гліцерину у клітинах бактерій – окиснювальний та редукційний [3].

В окиснювальному шляху НАД⁺-залежна гліцериндегідрогеназа каталізує перетворення гліцерину на дигідроксиацетон, а потім гліколітичний фермент дигідроксиацетонкіназа фосфорилує отриману сполуку, яка після цього включається у гліколіз [3].

Редукційний шлях метаболізму гліцерину каталізується коензимом В₁₂-залежної гліцериндегідратази і пов'язаними з нею діолдегідратазами. Гліцерин перетворюється на 3-гідроксипропіональдегід, а НАД⁺-залежна 1,3-пропандіол-дегідрогеназа розкладає цю сполуку до 1,3-пропандіолу, регенеруючи при цьому НАДН. Кінцевий продукт таких процесів – 1,3-пропандіол є специфічним продуктом метаболізму гліцерину і не може бути отриманий іншим способом анаеробного перетворення [3].

Багато мікроорганізмів здатні рости в анаеробних умовах, використовуючи гліцерин як єдине джерело вуглецю та енергії, наприклад: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Lactobacillus reuteri*. У *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *E. agglomerans*, *E. aerogenes* гліцерин метаболізується і окиснювальним, і редукційним шляхом [3].

У дріжджів гліцерин може також метаболізуватися через гліцерин-3-фосфат. Спочатку гліцеринкіназа фосфорилує гліцерин з утворенням цитозольного гліцерин-3-фосфату, який потім транспортується у мітохондрії. Після цього ФАД⁺-залежна мітохондріальна дегідрогеназа окиснює гліцерин-3-фосфат до дигідроксиацетонфосфату (ДГАФ), який переноситься назад у цитозоль. ДГАФ перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат за допомогою тріозофосфатізомерази. Гліцеральдегід-3-фосфат залучається до гліколізу [1].

Вже сьогодні спектр речовин, які можна отримувати мікробною конверсією гліцерину досить широкий. Це органічні кислоти (пропіонат, сукцинат, піруват, цитрат) [3, 4, 6, 7, 9], спирти (етанол, 1,3-пропандіол) [3, 4, 8], кетони (дигідроксиацетон) [3], амінокислоти (фенілаланін) [10], поліестери (полігідроксиалканоат) [3], пігменти (астаксантин, продігіозин) [3], екзополісахариди [11] поверхнево-активні речовини [2, 3].

Упродовж останніх років поверхнево-активні речовини (ПАР) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлено їх можливим практичним використанням в промисловості, а також для очищення навколишнього середовища. Перевагами ПАР мікробного походження перед синтетичними аналогами є їх біодеградабельність, стійкість у екстремальних умовах, різноманітна біологічна активність та нетоксичність. Такі їх властивості, як здатність до емульгування, зниження поверхневого та міжфазного натягу, дозволяють сподіватися на можливість їх використання для вирішення ряду глобальних проблем, таких як загроза екологічної кризи чи вичерпність запасів корисних копалин [12, 13].

У попередніх дослідженнях із забрудненою нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8 і показана його здатність синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуючими властивостями [14]. Досліджено закономірності синтезу ПАР на гліцерині та оптимізовано поживне середовище для культивування *N. vaccinii* K-8 на цьому субстраті з використанням математичних методів планування експерименту.

Мета даної роботи – дослідження можливості інтенсифікації біосинтезу ПАР *N. vaccinii* K-8 на гліцерині за присутності органічних кислот, визначення їх хімічного складу та впливу на процеси біодеструкції нафти.

Культивування бактерій проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ – 0,5; KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄×7H₂O – 0,1; CaCl₂×2H₂O – 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і FeSO₄×7H₂O – 0,001.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин в концентрації 1,5 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту (72 год культивування), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % гліцерину. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Як попередники синтезу ПАР *N. vaccinii* K-8 використовували цитрат та фумарат натрію, які вносили у середовище у вигляді 10 %-х розчинів: цитрат у концентрації 0,01-0,5 % (масова частка) на початку культивування та на початку стаціонарної фази росту; фумарат у концентрації 0,1-0,5 % (масова частка) на початку стаціонарної фази росту.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30°C упродовж 168 год.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1) поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини (КР), який вимірювали за допомогою платинової і скляної пластинки за методом Вільгельмі;

2) для експрес-оцінки вмісту ПАР в культуральній рідині використовували показник, названий «умовна концентрація ПАР». Цей показник визначають як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зростання поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР, що визначається описаним методом, виражається в безрозмірних одиницях і надалі буде позначатися як ПАР*.

3) індекс емульгування (E_{24} , %) нативної культуральної рідини, який визначали за методом, описаним у праці [5]. Як субстрат для емульгування використовували соняшкову олію.

4) концентрація ПАР, яку визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів сумішшю Фолча (хлороформ – метанол 3:1) з супернатанту культуральної рідини (КР). Одержаний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові ІР–1М2 (Росія) при температурі 55 °C та абсолютному тиску 0,4 атм. Для одержання супернатанту КР центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв

Для визначення хімічного складу ПАР проводили тонкошарову хроматографію на силуфолових пластинках фірми ("Kavalier", Чехія) у полярній (хлороформ, метанол і вода у співвідношенні 65:15:2) та неполярній (гексан і діетиловий ефір у співвідношенні 2:1) системах. ПАР попередньо екстрагували із супернатанту та культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу у співвідношенні 2:1.

Ідентифікацію сполук здійснювали шляхом забарвлення пластинок спиртовим розчином фосфомолібденової кислоти (нейтральні ліпіди), розчином нінгідрину (ліпопептиди) та антроновим реактивом (гліколіпіди).

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю препаратів ПАР *N. vaccinii* K–8 проводили на модельній водоймі, якою слугувала ємність з 2 л бюветної води. На поверхню води наносили нафту у концентрації 2,6 г/л. Після цього дисперсійно розпиляли суспензію клітин (20 мл, титр клітин $9,8 \cdot 10^8$ КУО/мл та $4,9 \cdot 10^8$ КУО/мл) або препарати ПАР (супернатант культуральної рідини, нативна та стерильна культуральна рідина) у кількості 5 або 15 % від об'єму забрудненої води залежно від варіанту. Як джерело біогенних елементів, необхідних для життєдіяльності нафтоокиснювальних бактерій, використовували діамонійфосфат у концентрації 0,01 % від об'єму води. У частині зразків через шість днів експозиції здійснювали повторну обробку води препаратами ПАР у тій же концентрації, що й першого разу. Загальну кількість живих клітин (КУО/мл) у бюветній воді (до забруднення нафтою), а також у всіх модельних водоймах визначали за методом Коха на середовищі МПА впродовж усього часу експозиції. Також фіксували зміни у видовому складі мікрофлори забрудненої води. Описували типи колоній (пряме спостереження) та клітин (мікроскопіювання за допомогою світлового мікроскопа з імерсією). Ємності стояли у відкритому стані, при кімнатній температурі (20 °C). Тривалість спостереження становила 30 діб.

Моделювання забрудненого нафтою піску здійснювали так. Досліджувані зразки з 1 кг промитого, сухого, стерильного піску забруднювали 20 мл нафти. У зразки вносили препарати ПАР у кількості 300 мл (препарати містили по 0,01% діамонійфосфату). Контролем слугував забруднений пісок без препарату. Зразки періодично перемішували для покращення аерації та зволожували стерильною водою.

Для отримання суспензії клітин використовували однодобову культуру *N. vaccinii* K–8, вирощену на ГКА. Змив проводили з 4 пробірок у 200 мл стерильної водопровідної води. Для розведення суспензії клітин використовували стерильну водопровідну воду. Після цього визначали титр клітин (за методом Коха).

Вміст нафти у досліджуваних зразках визначали ваговим методом. Спочатку здійснювали трикратну екстракцію нафти гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарному апараті ІР – 1М2 (Росія) при температурі 55°C та абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Літературні дані щодо синтезу ПАР представниками роду *Nocardia* є досить обмеженими. Відомо, що штам *Nocardia* sp.L-417 синтезує комплекс речовин з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями під час росту на гексадекані, складовими яких є сполуки ліпідної природи [15]. Виходячи з припущення про синтез ПАР ліпідної природи штамом *N. vaccinii* К-8 і був зумовлений вибір цитрату натрію як попередника синтезу ПАР. Підвищення синтезу ПАР при внесенні цитрату натрію у середовище культивування зумовлене його активуючим впливом на фермент ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, і ПАР ліпідної природи [16].

На першому етапі визначали вплив на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8 низьких концентрацій цитрату. Як видно із наведених у табл.1 даних, внесення цитрату натрію на початку культивування не супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР, а більше того, спричинювало ефект інгібування, пропорційний концентрації. Внесення цитрату натрію на початку стаціонарної фази росту дало змогу підвищити синтез ПАР на 25 %.

Таблиця 1

**Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8
від моменту внесення та концентрації цитрату натрію**

Концентрація цитрату, %	Момент внесення, год	ПАР*		Е ₂₄ , %		ПАР, г/л		Біомаса, г/л
		значення	% від контролю	значення	% від контролю	значення	% від контролю	
0	-	2,0±0,1	100	60±3,0	100	1,88±0,09	100	3,5±0,18
0,01	0	2,0±0,1	100	57±2,9	95,8	2,14±0,10	113,8	3,0±0,15
	72	2,1±0,11	105	64±3,2	108,2	1,83±0,09	97,3	2,4±0,12
0,02	0	1,8±0,09	90	59±3,0	98,4	1,79±0,09	95,2	2,3±0,12
	72	2,1±0,11	105	60±3,0	100,3	1,96±0,10	104,3	3,5±0,18
0,03	0	1,3±0,07	65	66±3,3	110,7	1,65±0,08	87,8	1,4±0,07
	72	2,0±0,1	100	65±3,3	109,0	2,05±0,10	109,0	2,9±0,15
0,04	0	1,4±0,7	70	67±3,4	112,1	1,52±0,07	80,9	1,7±0,09
	72	2,3±0,12	115	65±3,3	109,7	2,21±0,11	117,6	2,6±0,13
0,05	0	1,1±0,06	55	62±3,1	103,9	1,32±0,06	70,2	1,8±0,09
	72	2,5±0,13	125	60±3,0	101,0	2,34±0,12	124,5	2,5±0,13

У подальшому досліджували вплив вищих концентрацій цитрату на синтез ПАР *N. vaccinii* К-8, оскільки за даними табл. 1 у міру підвищення концентрації внесеного на початку стаціонарної фази росту цитрату натрію до 0,05 % спостерігали збільшення концентрації ПАР. Дані наведено у табл. 2.

Як і у попередніх дослідженнях, за внесення цитрату на початку культивування не відбувалося підвищення синтезу ПАР, а лише деяке збільшення рівня біомаси. У разі внесення цитрату натрію на початку стаціонарної фази спостерігали інтенсифікацію синтезу ПАР (табл 2).

Таблиця 2

**Визначення впливу цитрату натрію у вищих концентраціях
на синтез ПАР штамом *N. vaccinii* K-8**

Концентрація цитрату, %	Момент внесення	ПАР*		Біомаса, г/л
		значення	% від контролю	
0	0	2,0±0,1	100	0,8±0,04
0,1	0	2,0±0,1	100	1,2±0,06
	72	2,0±0,1	100	0,8±0,04
0,3	0	1,9±0,95	95	1,1±0,06
	72	2,2±0,11	110	0,9±0,05
0,5	0	2,0±0,1	100	1,0±0,05
	72	2,5±0,12	125	0,8±0,04

З наведених у табл. 2 видно, що внесення вищих концентрацій цитрату не супроводжувалося суттєвим підвищенням синтезу ПАР. Тому наступним етапом досліджень було визначення хімічного складу синтезованих *N. vaccinii* K-8 поверхнево-активних речовин. Знаючи хімічну структуру продуктів синтезу, можна підібрати відповідні попередники, що будуть сприяти інтенсифікації процесу. Також знання хімічного складу сполук дасть змогу вибрати відповідні методи виділення і очищення цільового продукту. Результати визначення хімічного складу наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Характеристика ліпідів, синтезованих *N. vaccinii* K-8

Умови культивуванн я	Препарат ПАР	Якісний склад	
		Нейтральні ліпіди	Гліколіпіди
Без попередників	культуральна рідина	триацилгліцероли <i>n</i> -алканові кислоти міколові кислоти	трегалозо-діацелати трегалозо-6,6'-диміколати
	супернатант	міколові кислоти триацилгліцероли <i>n</i> -алканові кислоти	трегалозо-діацелати трегалозо-6,6'-диміколати
З внесенням 0,5 % цитрату натрію	супернатант	міколові кислоти триацилгліцероли <i>n</i> -алканові кислоти	трегалозо-діацелати трегалозо-6,6'-диміколати

З даних, наведених у табл. 3 видно, що у складі досліджуваних ПАР нам вдалося виявити нейтральні (міколові та *n*-алканові кислоти) та гліколіпіди (трегалозо-діацелати, трегалозо-6,6'-диміколати). Певна кількість нейтральних ліпідів залишаються неідентифікованими. Також поки що не ідентифіковано якісний склад аміно- та частину гліколіпідів. Основною структурною одиницею гліколіпідів є молекула вуглеводу, яка етерифікована довголанцюговими аліфатичними чи гідроксиаліфатичними кислотами [12]. Враховуючи хімічний склад гліколіпідів, було вирішено використовувати як попередник синтезу ПАР C_4 -дикарбонові кислоти – попередники глюконеогенезу, які забезпечують постачання вуглеводів для синтезу гліколіпідних ПАР. Як C_4 -блоки використовували фумарат натрію.

На наступному етапі аналізували вплив окремого та спільного внесення цитрату й фумарату натрію на синтез ПАР штамом Л-8 (табл. 4). Як було визначено раніше (див. табл. 1), сприятливий вплив попередників спостерігається за умови їх внесення на початку стаціонарної фази росту, тому цитрат і фумарат вносили в цей період культивування бактерій.

Таблиця 4

Синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* К-8 у разі внесення цитрату та фумарату натрію на початку стаціонарної фази росту

Органічна кислота	Концентрація, органічних кислот, %	ПАР*		E ₂₄ , %	
		значення	% від контролю	значення	% від контролю
Без органічних кислот	0	2,0±0,1	100	55±2,8	-
Цитрат	0,1	2,2±0,11	110	63±3,2	114,5
	0,3	2,4±0,12	120	66±3,3	120,0
	0,5	2,6±0,13	130	64±3,2	116,4
Фумарат	0,1	2,0±0,1	100	56±2,8	101,8
	0,3	2,2±0,11	110	54±2,7	98,2
	0,5	2,4±0,12	120	58±2,9	105,5
Цитрат + фумарат	0,1 + 0,1	2,5±0,13	125	62±3,1	112,7
	0,2 + 0,2	2,7±0,14	135	63±3,2	114,5

Аналізуючи дані, наведені у табл. 4, можна зробити висновок, що внесення як цитрату, так і фумарату на початку стаціонарної фази росту сприяє інтенсифікації синтезу ПАР. Слід зазначити, що позитивний ефект від додавання цитрату у поживне середовище проявляється сильніше (до 30 % підвищення умовної концентрації ПАР проти 20 % для фумарату). Але найвищі результати – підвищення на 35 % у порівнянні з контрольним дослідом – були отримані за умови спільного внесення цитрату та фумарату.

На наступному етапі досліджували можливість очищення забруднених нафтою екосистем за присутності клітин *N. vaccinii* К-8. Упродовж першого тижня під час візуального спостереження на поверхні модельних водойм не відзначалось змін. Нафта не змінювала структуру і плівка не руйнувалась (рис. 1). Помітні зміни у структурі нафтової плівки на поверхні водойм почали спостерігатися з 15-ої доби. У подальшому нафта швидко деградувала та змінювала свою початкову структуру, що відмічалось нами візуально. Плівка втрачала маслянистість, перетворювалася на скупчення невеликих сухих пластівців, менша частина яких знаходилася на поверхні води, а більша – осіла на дно ємностей після перемішування. До 20-ї доби на пластівцях нафти у водоймах, куди вносились суспензії клітин, добре помітним був розвиток мікрофлори у вигляді прозорої слизоподібної маси (рис. 1).

Після того, як структура нафтової плівки перестала змінюватись, а отже припинилося розкладання нафти (30 доба), з кожного зразка були відібрані середні проби для встановлення її залишкової кількості та мікробіологічного контролю мікрофлори води.

Результати вимірювань кількості нафти та відсоток її деструкції наведено у табл. 5.

Таблиця 5

Вплив концентрації клітин та кількості процедур обробки *N. vaccinii* К-8 на ступінь деструкції нафти

Концентрація клітин у суспензії, КУО/мл	Кількість процедур обробки	Залишкова концентрація нафти*, г/л	Відсоток асимільованої нафти, %
9,8·10 ⁷	одна	0,14±0,007	94±4,2
	дві	0,45±0,023	91,5±4,5
4,9·10 ⁷	одна	0,56±0,028	89±4,6
	дві	2,78±0,14	60±3,0
Контроль	без обробки	6,95±0,35	–

П р и м і т к а. Повторна обробка забрудненої води здійснювалась на 6 добу дослідю.

Тут і в табл. 8 – підвищення значень залишкової концентрації нафти у порівнянні з початковим (2,6 г/л) спричинене зменшенням об'єму води внаслідок випаровування.

З даних, наведених у табл. 5, видно, що найвищий показник мікробної деструкції нафти (98 %) досягається при використанні суспензії з вищою концентрацією клітин без повторного розпилення препаратів.

Слід зауважити, що в обох варіантах з повторним розпиленням ефективність очищення від нафти була нижчою, ніж у разі однократного внесення суспензій тих же концентрацій. Це можна пояснити тим, що після повторного внесення деструктори нафти (*N. vaccinii* K-8) не витримують конкуренції з боку представників нативної мікрофлори, але при цьому негативно впливають на споживання ними нафти. Це може бути спричинене посиленням конкуренції за макро- чи мікроелементи, або навіть за кисень (наприклад, всередині нафтових «пластівців», кількість яких зростає у часі).

Під час експерименту періодично проводився мікробіологічний контроль забрудненої води. Результати наведено у табл. 6 і 7.

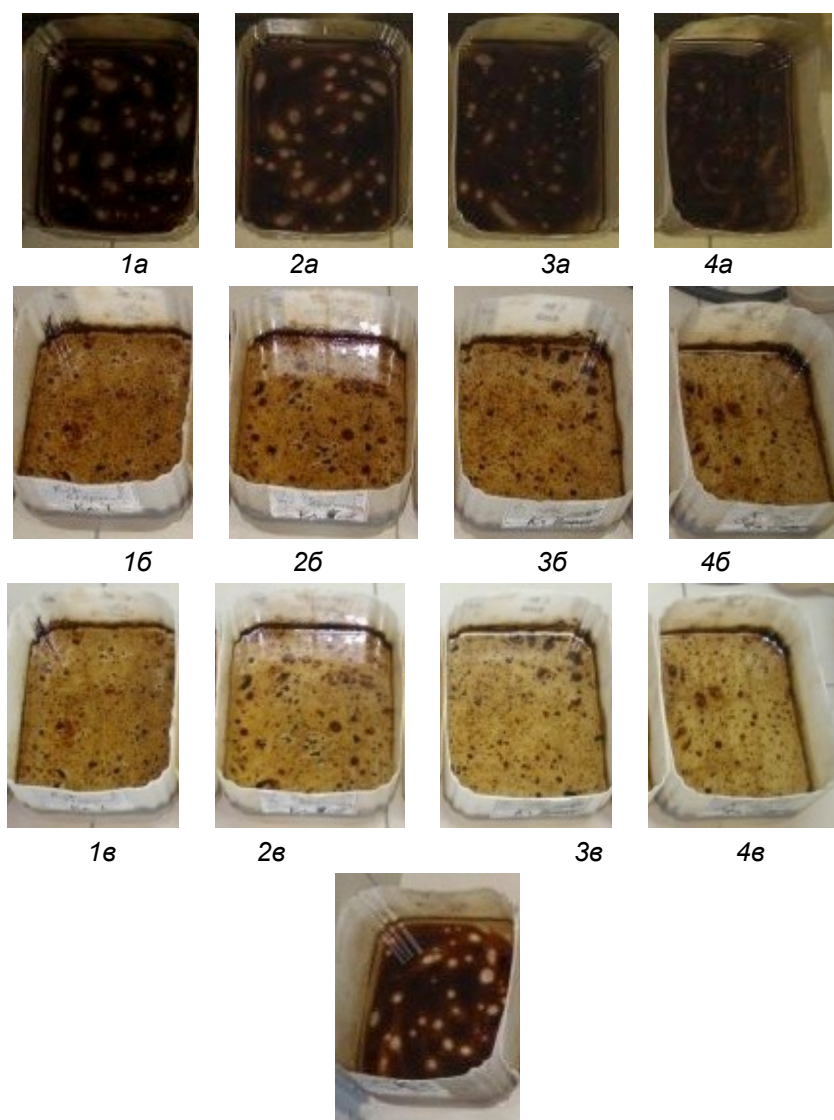


Рис. 1. Зміна структури нафтової плівки після обробки суспензією клітин. Варіанти обробки (зліва направо): 1 – однократне розпилення *нерозведеної* суспензії; 2 – двократне розпилення *нерозведеної* суспензії; 3 – двократне розпилення *розведеної* суспензії; 4 – однократне розпилення *розведеної* суспензії; 5 – контроль (без обробки). Тривалість експозиції: а – 1 доба; б – 15 діб; в – 24 доби

Як видно з даних, наведених у табл. 6 та 7, загальна концентрація клітин у забрудненій воді до кінця досліджу зростає. У той же час концентрація клітин *N. vaccinii* К–8 зменшується впродовж кількох діб після розпилення суспензії, а до кінця експерименту вона стає нульовою. Це може бути спричинено тим, що після першого розпилення *N. vaccinii* К–8 є колонізатором субстрату, переводячи за допомогою ПАР нафту у доступну для споживання форму. Але такий субстрат одразу починають споживати представники нативної мікрофлори води, які, ймовірно, мають вищу спорідненість з ним, ніж внесені нами деструктори нафти. Після другого розпилення, клітини *N. vaccinii* К–8 гинуть за кілька діб через те, що не можуть ефективно конкурувати за субстрат із вже розвиненою природною мікрофлорою.

Таблиця 6

Мікробіологічний контроль забрудненої нафтою води після обробки суспензією клітин *N. vaccinii* К–8

Концентрація клітин у суспензії, КУО/мл	Кількість процедур обробки	Загальна концентрація клітин (КУО/мл) у воді впродовж діб					
		0	1	8	15	24	30
$9,8 \cdot 10^7$	одна	$9,81 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^8$
	дві	–	–	$8,7 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^8$
$4,9 \cdot 10^7$	одна	$4,92 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^6$	$9,3 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^7$
	дві	–	–	$2,2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$
Контроль (без обробки)		$1 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^9$	$8,5 \cdot 10^6$

П р и м і т к а (тут і у табл. 8). Повторне внесення суспензії клітин у відповідних варіантах здійснювалось на 6 добу експерименту. Для визначення показника КУО/мл вирощування здійснювали на МПА.

Зауважимо, що наведені у табл. 8 дані дають змогу пояснити зв'язок між початковою кількістю клітин *N. vaccinii* К–8 та ефективністю деструкції нафти. Беремо до уваги той факт, що вищезгадані клітини гинуть через кілька діб після внесення суспензії. Стає зрозуміло, що для більш повного розкладання нафти *N. vaccinii* К–8 повинна синтезувати якомога більше ПАР за такий обмежений період часу. У таких умовах внесення більшої кількості клітин забезпечує перевагу у кількості синтезованих ПАР, а отже, зростає ефективність деструкції нафти.

Таблиця 7

Зміна концентрації клітин *N. vaccinii* К–8 в ході експерименту

Концентрація клітин у суспензії, КУО/мл	Кількість процедур обробки	Концентрація клітин <i>N. vaccinii</i> К–8 у воді впродовж діб, КУО/мл					
		0	1	8	15	24	30
$9,8 \cdot 10^7$	одна	$9,8 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^5$	0	0	0	0
	дві	$9,8 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^5$	$7,9 \cdot 10^5$	0	0	0
$4,9 \cdot 10^7$	одна	$4,9 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$	0	0	0	0
	дві	$4,9 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^5$	0	0	0
Контроль (без обробки)		0	0	0	0	0	0

Крім аналізу кількісного складу мікрофлори забрудненої нафтою води, здійснювали спостереження за змінами у видовому складі. Вихідний мікробіологічний контроль води показав наявність у ній бактеріальної мікрофлори у концентрації $1 \cdot 10^3$ КУО/мл, яка була представлена двома морфотипами колоній:

1. Круглі, тьмяно-білого кольору з фстончатим краєм, профіль випуклий, поверхня гладка, колонії мають точковий характер, прозорі, тістоподібної консистенції, в результаті мікроскопіювання виявлено, що колонії утворені короткими неспороутворювальними паличками (1–2 мкм).

2. Круглі, жовтого кольору з рівним краєм, профіль випуклий, поверхня гладка, колонії мають точковий характер, блискучі, тістоподібної консистенції, за результатами мікроскопіювання колонії також утворені короткими неспороутворювальними паличками (1–2 мкм).

У ході досліджень видовий склад нафтоокиснювальної мікрофлори суттєво змінювався та розширювався. За час спостереження нами було виявлено 17 морфотипів мікроорганізмів. Така різноманітність могла бути спричинена як активізацією вже присутніх у воді мікроорганізмів, так і потраплянням нових із повітря. Крім цього, використана у експерименті нафта теж містила певну мікрофлору.

Отже, обробка забрудненої води суспензією клітин *N. vaccinii* K-8 активувала процес біодеструкції нафти, що підтверджувалося значним розширенням набору морфотипів та показником ефективності очищення. Максимальна ефективність (98 %) спостерігалась після одноразової обробки суспензією клітин з титром $9,8 \cdot 10^7$ КУО/мл.

Для кращого вивчення механізму впливу *N. vaccinii* K-8 на процеси біодеградації нафти нами було вивчено процес її розкладання після внесення препаратів ПАР.

Показники умовної концентрації ПАР у використовуваних препаратах: нативна культуральна рідина – $2,3 \pm 0,11$; супернатант культуральної рідини – $1,8 \pm 0,09$; стерильна культуральна рідина – $1,3 \pm 0,07$.

Аналіз результатів експерименту показав, що максимальна ефективність деструкції нафти у забрудненій воді досягається після обробки супернатантом культуральної рідини. Одразу після внесення препарату нами були відмічені суттєві зміни – суцільна нафтова плівка емульгувалася і утворила краплини та плями на поверхні модельних водойм. Наступні 13 діб характеризувалися інтенсивним розкладанням нафти. На 5–6 добу нафта почала втрачати маслянистий блиск, на дно водойм почали осідати поодинокі нафтові пластівці. На 14 добу експозиції нафта повністю втратила характерний блиск, зник також мазутний запах. На 24–25 добу перестали відмічатись зміни у модельних водоймах. За візуальною оцінкою поверхня в них очистилась від нафти на 60–70 %.

Під час внесення у модельні водойми культуральної рідини (нативної та стерильної) характер процесу був таким самим, як описано для супернатанту, але швидкість його була нижчою. Для нативної КР початок осідання нафтових пластівців відмічався на 7–8 добу експерименту, для термічно обробленої – на 10–11. Повне зникнення маслянистого блиску при обробці нативною КР відбувалось на 16–17 добу спостереження, термічно обробленою – на 18–19. В обох випадках на 30 добу експерименту нами переставали відмічатись зміни у модельних водоймах. Після цього були відібрані проби та проведено вимірювання кількості залишкової нафти у зразках та ступінь її деструкції наведено у табл. 8.

Таблиця 8

Вплив препаратів поверхнево-активних речовин на мікробну деструкцію нафти у забрудненій воді

Препарат ПАР		Об'єм внесеного препарату, %	Кількість процедур обробки	Залишкова концентрація нафти, г/л	Відсоток асимільованої нафти, %
Супернатант КР		5	одна	2,47 ± 0,124	54,7 ± 2,74
		15	одна	2,25 ± 0,113	58,8 ± 2,94
		5*	дві	1,79 ± 0,090	67,2 ± 3,36
Культуральна рідина	Нативна	5	одна	2,41 ± 0,120	52,8 ± 2,64
		15	одна	2,29 ± 0,115	58,0 ± 2,75
		5*	дві	2,10 ± 0,105	59,5 ± 3,08
	Стерильна	5	одна	3,43 ± 0,172	37,1 ± 1,86
		15	одна	3,58 ± 0,179	34,4 ± 1,72
		5*	дві	3,17 ± 0,159	42,0 ± 2,10
		Контроль	0	без обробки	5.46 ± 0.273

Примітка. * – частка препарату, використана для першої обробки. Під час другої обробки використовувалась така ж кількість препарату.

З даних, наведених у табл. 8 видно, що максимальна ефективність розкладання нафти у забрудненій воді (67 %) досягається у разі двократної обробки супернатантом культуральної рідини. Дещо нижчі показники отримані за однократного внесення супернатанту та за одно- та двократного внесення нативної культуральної рідини (50–60 %). За умови використання

стерильної культуральної рідини ефективність була помітно нижча у порівнянні з попередніми двома варіантами – в межах 35–43 %.

Досягнення максимальної ефективності очищення при обробці супернатантом може бути зумовлене тим, що у культуральній рідині чи у зовнішніх структурах клітин *N. vaccinii* K–8 присутні так звані «баластні» речовини (швидше за все продукти метаболізму), які негативно впливають на активність ПАР. Інгібування може бути спричинене як змінами у складі чи структурі ПАР, так і взаємодією з цільовим об'єктом (в даному випадку з нафтовою плівкою чи поверхнею нафтових пластівців), що призводить до зменшення площі контакту. Під час центрифугування такі речовини видаляються.

Мікробіологічний контроль забрудненої нафтою води показав, що на першу добу експерименту концентрація клітин залежала від внесеного об'єму препарату (більші значення у разі внесення 15 % препаратів ПАР). На 9 добу спостереження максимальна концентрація клітин ($3,2 \cdot 10^9$ КУО/мл) була зафіксована для варіанту з двократною обробкою супернатанту, це ще раз підтвердило, що у цій модельній водоймі відбувається активна деструкція нафти. В інших варіантах максимальна концентрація клітин була зафіксована пізніше. Отримані дані корелюють з показниками ефективності очищення забрудненої води (табл. 9) та результатами візуального спостереження. Видовий склад мікрофлори забрудненої води змінювався та розширювався. За 24 доби спостереження нами було виявлено 11 морфотипів мікроорганізмів

У обох експериментах після обробки забрудненої нафтою води як суспензією клітин штаму K-8, так і препаратами ПАР, спостерігалася активація процесу розкладання нафти природною мікрофлорою. Її видовий склад зазнавав послідовних змін, суттєво розширюючись, що свідчило про утворення нафтоокиснювальної мікробної спільноти. Максимальна ефективність деструкції нафти у воді досягалася після обробки суспензією клітин *N. vaccinii* K–8. Тому такий метод очищення водойм від нафти є пріоритетним. При цьому використовувані нафтоокиснювальні бактерії не пригнічують природну мікрофлору водойми, тому не наносять шкоди її екосистемі.

Для більш повної оцінки можливості використання препаратів ПАР *N. vaccinii* K–8 у природоохоронних технологіях були проведені дослідження з очищення забрудненого нафтою піску. Пісок був попередньо простерилізований для виключення фактора впливу нативної мікрофлори. Відомо, що пісок має велику площу контакту, тому добре адсорбує нафту на своїй поверхні. Через це необхідно шукати способи ефективного видалення забруднень такого характеру. Упродовж експериментів періодично проводилось перемішування та зволоження забрудненого нафтою піску. З літературних даних відомо, що аерація необхідна для інтенсифікації процесу деструкції нафти. Ймовірно це спричинене підвищенням споживанням кисню у процесах розкладання нафтових фракцій.

Після закінчення експерименту здійснили екстракцію залишкової нафти і проаналізували ефективність очищення (табл. 9).

Таблиця 9

**Очищення піску від нафти після обробки препаратами
поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* K–8**

Препарат ПАР	Кількість залишкової нафти в пробі, г	Відсоток деградованої нафти, %
Нативна культуральна рідина	18,4±0,92	9,1±0,45
Супернатант культуральної рідини	18,2±0,91	10,1±0,51
Контроль	20,3±1,01	–

П р и м і т к а. Показники умовної концентрації ПАР у препаратах: нативна культуральна рідина – $2,3 \pm 0,11$; супернатант культуральної рідини – $1,8 \pm 0,09$.

Як видно з представлених у табл. 9 даних, різниця у кількості залишкової нафти дуже незначна. Але деструкція нафти у зразках, оброблених супернатантом (ефективність склала 10 %) відбувалася в результаті активності мікрофлори нафти або повітря, оскільки вплив нативної мікрофлори піску та води був виключений і супернатант не містив клітин *N. vaccinii* K–8. Присутність клітин нафтоокиснювальних бактерій у разі обробки нативною культуральною рідиною

не спричинила підвищення ефективності очищення, остання навіть дещо знизилась (до 9 %). Такі результати підтверджують припущення про наявність у постферментаційній культуральній рідині інгібуючих факторів.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що на процес мікробної деструкції нафти у забрудненому піску впливають поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* K-8 і не впливає (принаймні безпосередньо) присутність самих бактерій.

Таким чином, в ході виконання даної роботи показано можливість інтенсифікації біосинтезу ПАР *N. vaccinii* K-8 під час культивування на гліцерині присутності попередників. Сумісне внесення цитрату й фумарату натрію на початку стаціонарної фази росту дало змогу підвищити синтез ПАР *N. vaccinii* K-8 на 35 %. ПАР *N. vaccinii* K-8 за хімічним складом є комплексом нейтральних ліпідів, ліпопептидів та гліколіпідів. Дослідження мікробної деструкції нафтових забруднень показало, що найвища ефективність очищення забрудненої води (98 %) спостерігалася за одноразової обробки суспензією клітин з титром $9,8 \cdot 10^7$ КУО/мл. У разі використання препаратів ПАР максимальний ступінь деградації нафти у воді (67 %) та піску (10 %) було досягнуто після внесення препарату ПАР у вигляді супернатанту культуральної рідини.

Список використаної літератури

1. Matsuzawa T., Ohashi T. The *gld1+* gene encoding glycerol dehydrogenase is required for glycerol metabolism in *Schizosaccharomyces pombe* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 87. – P. 715–727.
2. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T // J. Biosci. Bioeng. – 2007. – V. 104, № 1. – P. 78–81.
3. Paulo G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Adv. – 2009. – V. 27. – P. 30–39.
4. Syed S., Ramon G. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – V. 18. – P. 213–219.
5. Cooper D. C., Goldenger B. G. // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – №2. – P. 224–229.
6. Rywin'ska A., Rymowicz W. High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 37. – P. 431–435.
7. Rywin'ska A., Rymowicz W. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation // Food. Technol. Biotechnol. – 2009. – V. 47. – № 1. – P. 1–6.
8. Seo J.W., Seo M.Y. Identification and utilization of a 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1,3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumonia* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 85. – P. 659–666.
9. Rymowicz W., Fatykhova A. R. et al. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 87. – P. 971–979.
10. Khamduang M., Packdibamrung K. Production of L-phenylalanine from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 36. – P. 1267–1274.
11. Freitas F., Alves V. D. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol // Bioresource Technology. – 2009. – V. 100. – P. 859–865.
12. Волошина І.М., Пирог Т.П. Поверхнево-активні речовини мікробного походження // Харчова промисловість. – 2008. – № 6. – С. 54–57.
13. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина І.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 544 – 550.
14. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Штам бактерій *Nocardia vaccinii* K-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин // Харчова промисловість – 2008. – № 7. – С. 29 – 32.
15. Kim S.H., Lim E.J., Lee S.O., Lee J.D., Lee T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp.L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2000. – V 31. – P. 249–253.
16. Пирог Т.П., Тарасенко Д.А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 48–55.