

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Волошина Ірина Миколаївна

УДК 579.873:543.395:655.637

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ СИНТЕЗУ
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
НАФТООКИСНЮВАЛЬНИМИ БАКТЕРІЯМИ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Пирог Тетяна Павлівна**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біотехнології мікробного синтезу.

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор **Левандовський Леонід Вікторович**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біохімії та екології харчових виробництв.

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник **Ногіна Таїсія Михайлівна**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного Національної академії наук України, відділ фізіології промислових мікроорганізмів.

Захист відбудеться 11 червня 2008 р. о 11.00 год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, 01033, вул. Володимирська, 68.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, 01033, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий 11 червня 2008 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат технічних наук, доц.

Бублієнко Н.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Поверхнево-активні речовини (ПАР, біосурфактанти) мікробного походження викликають великий інтерес у дослідників – мікробіологів, біохіміків, молекулярних біологів, біотехнологів, екологів тощо. Цей інтерес зумовлюється тією роллю, яку виконують ці метаболіти у життєдіяльності клітини, їх значенням у взаємодії мікроорганізмів з оточуючим середовищем. Мікробні ПАР завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям привертають увагу науковців при вирішенні певних практичних завдань. Більшість з них пов'язані з глобальними проблемами, які стоять перед сучасною цивілізацією: забруднення довкілля, загроза екологічної кризи, вичерпання запасів корисних копалин та ін. Практичне значення мікробних ПАР зумовлено їх здатністю суттєво знижувати поверхневий і міжфазний натяг водних розчинів і емульгувати різні сполуки. Не дивлячись на те, що мікробні ПАР є відносно новим продуктом сучасної біотехнології, вони знаходять використання для очищення довкілля, у нафтодобувній, хімічній, фармацевтичній промисловості, сільському господарстві та медицині. Мікробні ПАР за своїми властивостями не поступаються синтетичним аналогам, а такі їх переваги як біодеградабельність і нетоксичність роблять їх перспективними для створення екологічно безпечних технологій. На Україні відсутнє промислове виробництво поверхнево-активних речовин, тому пошук і селекція активних продуцентів ПАР і розроблення біотехнології одержання цих сполук з різноманітними фізико-хімічними властивостями є актуальними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій за темами “Розробка та удосконалення мікробіологічних та біохімічних процесів в біотехнології та охорона навколишнього середовища” (2001 – 2005 рр.) та “Розроблення новітніх біотехнологій у мікробіологічній, фармацевтичній, харчовій промисловостях та охороні довкілля” (2006 – 2010 рр.), а також у рамках проекту Міністерства освіти і науки України «Розробка екологічно безпечного комплексного мікробного препарату для очищення довкілля від нафти і нафтопродуктів» (2006 – 2007 рр.), № державної реєстрації 0106U006888.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – розробка технології одержання поверхнево-активних речовин за допомогою нафтоокиснювальних бактерій.

Для виконання роботи необхідно було виконати такі завдання:

- виділити із забруднених нафтою природних зразків нафтоокиснювальні бактерії, дослідити їх здатність до синтезу ПАР за умов росту на різних вуглецевих субстратах;
- встановити оптимальні умови синтезу ПАР у процесі культивування продуцентів на гідрофільних і гідрофобних субстратах;
- дослідити фізико-хімічні властивості ПАР, синтезованих нафтоокиснювальними бактеріями;
- розробити технологічну і апаратурну схему одержання мікробних ПАР;

– дослідити можливість практичного використання ПАР для деградації нафтових забруднень.

Об'єкт дослідження – нафтоокиснювальні бактерії *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Mycobacterium* sp. К-2, *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2 та *Pseudomonas* sp. PS-27, накопичувальні культури нафтоокиснювальних мікроорганізмів та мікробні поверхнево-активні речовини.

Предмет дослідження – процес синтезу мікробних поверхнево-активних речовин, очищення води і ґрунту від нафтових забруднень.

Методи дослідження – мікробіологічні, біотехнологічні, фізико-хімічні, хімічні, математичні.

Наукова новизна роботи. Селекціоновано штамп *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – високоактивний продуцент метаболітів з емульгувальними і поверхнево-активними властивостями. Штамп захищено патентом України на винахід №77345 (2006 р.). Розроблено фізіологічні основи регуляції синтезу ПАР у процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофільних (етанол) і гідрофобних (гексадекан) субстратах. Вперше встановлено здатність бактерій роду *Rhodococcus* синтезувати ПАР під час росту на етанолі.

Визначено умови культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом і гексадеканом (природа і концентрація джерела азоту і вуглецю, співвідношення С/N, коефіцієнт масообміну, спосіб підготовки посівного матеріалу, тривалість процесу), що забезпечують підвищення синтезу ПАР у 3 – 4 рази. Встановлено стимулювальний вплив іонів заліза на ріст *R. erythropolis* ЕК-1 і синтез ПАР на гексадекані, що може свідчити про функціонування у цих бактерій алкангідроксилазного ферментного комплексу, що містить заліzosірковий білок рубредоксин.

У складі синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 ПАР виявлено гліко-, фосфо- і нейтральні ліпіди, які утворюють комплекс із сполуками полісахаридно-білкової природи. Встановлено залежність якісного складу ліпідів від умов культивування *R. erythropolis* ЕК-1.

Встановлено, що використання керамзиту як носія для іммобілізації нафтоокиснювальних бактерій дає змогу інтенсифікувати їх ріст і асиміляцію вуглеводневих субстратів. Виявлено залежність ступеню очищення забрудненої нафтою води іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 і *Nocardia vaccinii* К-8 від швидкості подачі води, рівня аерації і наявності біогенних добавок. Показана можливість інтенсифікації процесів деструкції нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних бактерій за присутності бактерій роду *Rhodococcus* і мікробних ПАР.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1, яка порівняно з існуючими у світі має такі переваги: відсутність у середовищі культивування мікроелементів і факторів росту, низький вміст солей (3 г/л, для інших продуцентів ПАР – до 10 г/л), вищий у 1,5 – 1,8 рази вихід ПАР від субстрату.

Технологія синтезу ПАР на етанолі апробована у дослідно-промислових умовах ВАТ «Стиролбіотех» (м. Обухів, Київська обл.).

Розроблено спосіб очищення води від нафти іммобілізованими на керамзиті клітинами *Nocardia vaccinii* К-8 і *R. erythropolis* ЕК-1. Ефективність очищення забрудненої нафтою (100 – 200 мг/л) води за високої швидкості потоку, низької аерації (до 0,1 л/л за хв) і періодичної подачі 0,01 % діамонійфосфату становила 99,5 – 99,8 %.

Показано, що ступінь утилізації сирової нафти (2 %, об'ємна частка) за 192 год вирощування накопичувальної культури нафтоокиснювальних бактерій становив 84 %, а за введення до неї *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і екзогенних ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, підвищувався до 90 і 93 – 94 % відповідно. Ці результати є основою для розробки високоефективних технологій для очищення довкілля від нафтових забруднень.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Експериментальна робота виконана особисто здобувачем. Автором проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено порівняльний аналіз з існуючими літературними даними. Автором особисто визначено показники росту і синтезу поверхнево-активних речовин (поверхневий натяг, умовну концентрацію ПАР, емульгувальні властивості, вміст вуглеводів у культуральній рідині) за різних умов культивування нафтоокиснювальних бактерій. Розроблено технологічну і апаратурну схему одержання мікробних ПАР, визначено оптимальні умови іммобілізації бактерій на керамзиті, а також ступінь деградації нафти нафтоокиснювальними бактеріями і синтезованими ПАР. Планування основних напрямів роботи, обговорення результатів та підготовка публікацій за результатами досліджень проходило за безпосередньої участі наукового керівника д.б.н., проф. Т.П.Пирог.

Визначення хімічного складу ПАР здійснювали спільно з к.х.н. Карпенко О.В. та к.б.н. Вільдановою-Марцишин Р.І. (Львівське відділення фізико-хімії і технології горючих копалин Інституту фізичної хімії НАН України); виділення та ідентифікацію нафтоокиснювальних бактерій, визначення показників очищення води від нафти на модельній лабораторній установці визначали спільно з Шевчук Т.А. (Інститут мікробіології і вірусології НАН України), які є співавторами робіт.

Аналіз 16S рРНК *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 здійснено к.т.н. Стабніковою О.В. (Наньянський технологічний університет, Сінгапур).

Волошина І.М. отримала відзнаку учасника четвертого конкурсу науково-технічних проектів “Інтелектуальний потенціал молодих вчених – місту Києву” за проект у напрямі “Новітні біотехнології” (2005). Нагороджена грамотою та грошовою премією за представлену усну доповідь на Всеросійській школі-конференції “Современная биотехнология – защите окружающей среды” (Пушино, Росія, 2006).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на II Міжнародному конгресі "Биотехнология – состояние и перспективы развития" (Москва, 2003); 69-й і 70-й наукових конференціях молодих вчених,

аспірантів та студентів Національного університету харчових технологій (Київ, 2003, 2004); 8-й, 10-й та 11-й Міжнародній Пущинській школі-конференції молодих вчених "Биология – наука XXI века" (Пушино, 2004, 2006, 2007); Міжнародній конференції "Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии" (Мінськ, 2004); X З'їзді Товариства мікробіологів України (Одеса, 2004); II та III Всеукраїнській науково-практичній конференції "Біотехнологія. Освіта. Наука" (Львів, 2004, Харків, 2006); Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених Київського університету ім. Т.Шевченка (Київ, 2004); I, II та III Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь та поступ біології" (Львів, 2005, 2006, 2007); Міжнародній конференції "Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды" (Саратов, 2005); Міжнародній конференції "Перспективы и проблемы развития промышленной биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран СНГ" (Мінськ, 2005); IX Міжнародній науково-технічній конференції "Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості: сьогодення і перспективи" (Київ, 2005); IV Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2005); Міжнародній науковій конференції "Экология и биология почв: проблемы диагностики и индикации" (Ростов-на-Дону, 2006); Міжнародній науковій конференції "Мікробні біотехнології" (Одеса, 2006); I Всеукраїнському з'їзді екологів (Вінниця, 2006), Всеросійській молодіжній школі-конференції "Современная биотехнология – защите окружающей среды" (Пушино, 2006), III Міжнародній конференції молодих учених «Биоразнообразие. Экология. Эволюция. Адаптация» (Одеса, 2007), Міжнародній конференції студентів та молодих учених "Modern Problems of Microbiology and Biotechnology" (Одеса, 2007).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 35 наукових праць, із них – 6 статей у фахових виданнях, 1 патент України на винахід та 28 тез доповідей.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 160 сторінках машинописного тексту і складається із таких структурних частин: "Вступ", "Огляд літератури" (2 розділи), "Результати досліджень" (5 розділів), "Обговорення", "Висновки", "Список використаних джерел", якій містить 184 посилань (з них 137 іноземних авторів), "Додатки". Робота містить 18 таблиць, 18 рисунків та 4 додатки.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Розділ 1. Поверхнево-активні речовини мікробного походження

Представлено дані літератури про синтез поверхнево-активних речовин мікроорганізмами різних фізіологічних і таксономічних груп. Наведено класифікацію ПАР за хімічною природою (гліколіпіди, ліпопептиди, ліпополісахариди, жирні кислоти та їх похідні, фосфоліпіди) і молекулярною масою (низько- та високомолекулярні), а також переваги мікробних поверхнево-активних речовин перед синтетичними аналогами.

Розділ 2. Практичне використання мікробних поверхнево-активних речовин

Наведено літературні дані щодо практичного використання мікробних ПАР у технології очищення доквілля від нафтових забруднень і важких металів, у нафтовидобувній промисловості для підвищення нафтовидобутку, у харчовій промисловості як емульгаторів, у медицині як антибактеріальних агентів, у хімічній промисловості як компонентів мийних засобів.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Розділ 3. Матеріали та методи досліджень

Об'єктами досліджень були бактерії *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Mycobacterium* sp. К-2, виділені із забруднених нафтою зразків ґрунту та води (Надворнянський нафтопереробний завод, Україна), а також штами *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2 та *Pseudomonas* sp. PS-27, ізольовані із забруднених нафтою ґрунтів Львівської області (Карпенко, 1996). У роботі використовували накопичувальні культури нафтоокиснювальних мікроорганізмів, виділені із зразків донних осадів шламовідстійників родовища «Долинанафтогаз» (Івано-Франківська обл., Україна).

Одержання накопичувальних культур нафтоокиснювальних мікроорганізмів. Накопичувальні культури одержували при внесенні 0,5 г ґрунту або 1 мл води в 10 мл мінерального середовища 1 такого складу (г/л): NH_4NO_3 – 3,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; Na_2CO_3 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01.

Як джерело вуглецю використовували легку нафту (густина 0,85 – 0,9 г/см³) у концентрації 0,12 – 2,0 % (об'ємна частка); рідкі парафіни (*n*-алкани, C₁₀ – C₁₄) виробництва нафтопереробного заводу «Галичина» (Дрогобич, Львівська обл., Україна) та гексадекан – 0,5 % (об'ємна частка). Культивування здійснювали при 30 °С, рН 7,0, упродовж 168 год. При послідовних пересівах інкулятом слугувала культура із попередньої ферментації в кількості 10 % від об'єму. Для одержання накопичувальних культур здійснювали 3 – 5 послідовних їх пересівів на середовищі 1.

Виділення чистих культур нафтоокиснювальних мікроорганізмів. Для одержання чистих культур накопичувальні культури розсівали методом Коха на агаризовані середовища: м'ясо-пептонний агар (МПА), глюкозо-картопляний агар (ГКА) та мінеральне середовище 1. Як джерело вуглецю у середовищі 1 використовували 0,01 % (об'ємна частка) нафти або рідких парафінів. Морфолого-культуральні і фізіолого-біохімічні властивості штамів визначали за загальноприйнятими методами (Методы общей бактериологии, 1984), ідентифікацію бактерій проводили за (Определитель бактерий Берги, 1997). Ідентифікацію *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 здійснювали також на основі аналізу 16S рРНК. ДНК із клітин *R. erythropolis* ЕК-1 виділяли за (Marum, 1961). Ампліфікацію генів 16S рРНК здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням універсальних еубактеріальних праймерів 27f та 1492r, описа-

них у роботі (Lane, 1991). Пошук найближчої філогенетичної послідовності у базі даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (США), здійснювали з використанням програми BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul, 1997).

Культивування нафтоокиснювальних бактерій. Бактерії вирощували на середовищах такого складу (г/л): **середовище 2** – KH_2PO_4 – 6,8; NaOH – 1,0; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; рН 6,8 – 7,0; **середовище 3** – KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; рН 6,8 – 7,0; **середовище 4** – NH_4NO_3 – 4,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 8×10^{-4} ; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5×10^{-6} ; пептон – 1,0; дріжджовий екстракт – 1,0; рН 6,8 – 7,0; **середовище 5** – NaNO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат натрію – 5,0; рН 6,8 – 7,2. Як джерело вуглецю та енергії використовували, % (об'ємна частка): легку нафту (густина 0,85 – 0,9 г/см³) – 0,06÷2,0; рідкі парафіни – 0,5÷2,0; гексадекан – 1÷3; етанол – 1÷2; глюкоза – 1% (масова частка).

В одному з варіантів у середовищі 2 NH_4NO_3 (0,6 г/л) було замінено на еквімолярну за азотом концентрацію KNO_3 (1,5 г/л). Бактерії культивували також на середовищах 2 і 3, які містили як джерело азоту KNO_3 (1,0 г/л) або NaNO_3 (0,85 г/л). Концентрація NaNO_3 еквімолярна за азотом 1,0 г/л нітрату калію. Для визначення оптимального співвідношення С/Н бактерії вирощували на середовищі 3, яке містило 2 % (об'ємна частка) гексадекану та KNO_3 в концентраціях 0,5, 1,0, 1,5 та 2,0 г/л (співвідношення С/Н становило 146:1; 73:1; 48,7:1 та 36,5:1 відповідно). В одному з варіантів бактерії вирощували на середовищі 3 з внесенням додатково (окремо або в різних комбінаціях) дріжджового автолізу 0,5 % (об'ємна частка), розчину мікроелементів (Rapp, 1979) та $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 г/л). Як регулятори росту та синтезу ПАР використовували синтетичні речовини ауксино-цитокінінової природи, які є похідними ди- і тетрагідротіофендіоксиду та зашифровані під номерами Д-82КИ, Д-82МК, ДГ-75М, ДГ-67М, ДГ-502, ДГ-503, ДГ-561, ДГ-7775, ДКИ, ДЦИ-2. Регулятори росту люб'язно надані співробітниками науково-інженерного центру «АКСО» Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на ротаційній качалці (200 об/хв) при 30 °С упродовж 48 – 168 год. Вплив температури на синтез ПАР вивчали у процесі вирощування нафтоокиснювальних бактерій *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 при температурі 20, 25 та 30 °С.

Як посівний матеріал використовували культури (24 – 48 год), вирощені на МПА або ГКА, а також культури із експоненційної фази росту, вирощені на мінеральних середовищах наведеного вище складу, концентрація інокуляту становила 5 – 10 % від об'єму середовища, що засівали.

Гетерофазне культивування *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 здійснювали за присутності керамзиту на мінеральному середовищі 1, що містило як джерело вуглецю нафту

0,12 % (об'ємна частка) та етанол 1,0 % (об'ємна частка). Керамзит попередньо подрібнювали до частинок розміром 2 – 3 мм, вносили по 5 г у колби об'ємом 750 мл та стерилізували при 121 °С упродовж години.

Під час вивчення ступеню деструкції нафти накопичувальними культурами нафтоокиснювальних мікроорганізмів їх вирощували на мінеральному середовищі 1 за присутності *R. erythropolis* ЕК-1 і поверхнево-активних речовин, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27.

Визначення показників росту бактерій. Біомасу визначали за оптичною густиною (540 нм) культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) за калібрувальним графіком (у разі гомогенної суспензії) або ваговим методом (у разі утворення конгломератів клітин). Питому швидкість росту мікроорганізмів розраховували, як описано в роботі (Перт, 1978). Концентрацію залишкової нафти визначали ваговим методом, а також методом інфрачервоної (ІЧ) спектроскопії на аналізаторі нафтопродуктів АН-1 (Росія) після екстракції її гексаном із культуральної рідини.

Визначення показників синтезу поверхнево-активних речовин. Поверхневий натяг (σ_s) визначали за методом Вільгельмі (Абрамзон, 1988). Для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник умовної концентрації поверхнево-активних речовин (ПАР*) (Guerra-Santos, 1984), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини у точці зниження поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину дотичних до кривої відповідає значенню ПАР*, яке виражається в умовних одиницях. Емульгувальні властивості (індекс емульгування) досліджуваних зразків визначали за методом, описаним у роботі (Cooper, 1987). Як субстрати для емульгування використовували вазелінову та соняшникову олії, рідкі парафіни, легку нафту (густина 0,80 г/см³). Кількість вуглеводів у культуральній рідині визначали фенол-сірчанним методом (Dubois, 1956). Кількість синтезованих ПАР аналізували ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча (хлороформ : метанол – 2 : 1) з наступним випарюванням розчинника у вакуумі (40 °С). Вихід ПАР від заданого субстрату визначали як відношення кількості синтезованих ПАР (в г/л) до заданої концентрації субстрату (в г/л) та виражали в г ПАР/г субстрату. Масообмінні характеристики систем оцінювали за сульфїтним числом, K_s , яке визначали за методом (Процессы и аппараты пищевых производств, 1986).

Визначення хімічного складу біосурфактантів. Низькомолекулярні поверхнево-активні ліпіди екстрагували з культуральної рідини, супернатанту культуральної рідини і клітинної суспензії сумішшю Фолча, з наступним упарюванням розчинника у вакуумі при 40 °С. Якісний аналіз ліпідів проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Alufoalien Kieselgel 60 ("Merck", Німеччина) в системах розчинників: для полярних ліпідів: хлороформ – метанол – вода (85:15:1); хлороформ – метанол – вода (65:25:4); для неполярних ліпідів: гексан – діетиловий ефір (2:1); гексан – діетиловий ефір – оцтова кислота (90:10:1). Ідентифікацію ліпідів здійснювали шляхом фарбування пластинок такими барвниками: 5 % спиртовим розчином фосфорномолі-

бденової кислоти та парами йоду (нейтральні ліпіди) (Ando, 1987); розчином нінгідрину (пептидоліпіди) (Алешникова, 1988); анісовим альдегідом та антроновим реактивом (гліколіпіди); реактивом Васьковського (фосфоліпіди) (Бергельсон, 1981).

Для виділення позаклітинних сурфактантів культуральну рідину центрифугували (5000 g, 20 хв) для осадження клітин продуцента, супернатант діалізували і концентрували у вакуумі (40 °С). У концентраті аналізували нейтральні моносахариди і уронові кислоти (на вуглеводному аналізаторі “Biotronik LC-2000” після попереднього гідролізу препарату), білок (на амінокислотному аналізаторі “Biotronik LC-2000”) і жирні кислоти (на газорідинному хроматографі “Hewlett-Packard 5890”).

Визначення показників очищення води від нафти на модельній лабораторній установці. Розрахунок продуктивності колонки здійснювали, виходячи із розмірів промислової установки для очищення води на одному з нафтопереробних підприємств України.

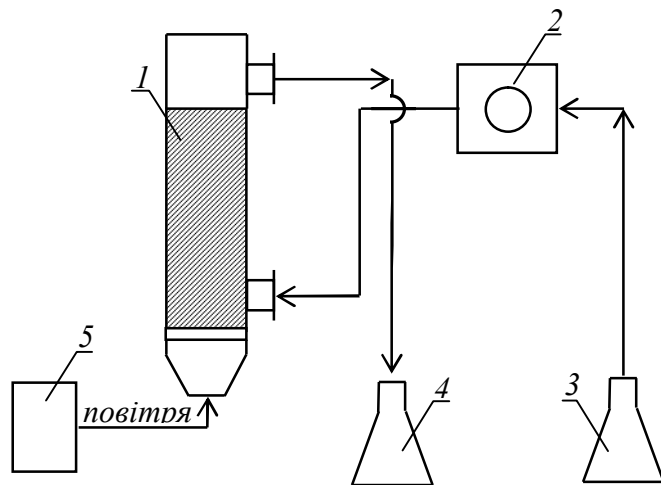


Рис. 1. Схема лабораторної установки для очищення забрудненої нафтою води іммобілізованими мікроорганізмами:

- 1 – колонка з керамзитом;
- 2 – перистальтичний насос;
- 3 – колба з водою, забрудненою нафтою;
- 4 – колба з очищеною водою;
- 5 – мікрокомпресор.

У модельній установці (рис. 1) використовували скляну колонку розміром 3,5×22 см, висота керамзитового шару – 18 см. Відповідно, об'єм керамзитового шару у лабораторній колонці становив $V = (3,14 \cdot 0,035^2 / 4) \cdot 0,18 = 0,00017 \text{ м}^3$. Таким чином, продуктивність лабораторної колонки $Q = V \cdot D = 0,00017 \cdot 4 \cdot 1000 = 0,68 \text{ л/год}$.

Як носій для іммобілізації клітин використовували подрібнений керамзит (розмір частинок 2 – 3 мм). Колонку заповнювали керамзитом, промивали водопровідною водою та стерилізували при 121°С упродовж 1 год. Подальшу роботу проводили у нестерильних умовах при кімнатній температурі (18 – 20 °С). Після іммобілізації клітин через колонку в умовах аерації пропускали водопровідну воду, яка містила 100 – 250 мг/л легкої нафти (густина 0,85 г/см³). Періодично у воду з нафтою добавляли 0,01 – 0,1 % (NH₄)₂HPO₄. Досліджували ступінь очищення води при продуктивності колонки 0,3; 0,5 та 0,68 л/год. Витрати повітря підтримували на рівні 0,05 та 0,10 л/л води за хв (мікрокомпресор АЭИ-3, НПО «Реле і автоматики», Україна). Тривалість безперервної роботи колонки становила 30 діб.

Розділ 4. Ріст нафтоокиснювальних бактерій і синтез ними поверхнево-активних речовин на гідрофобних і гідрофільних субстратах

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води виділені нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia*

vaccinii K-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Mycobacterium* sp.К-2, *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2 та *Pseudomonas* sp. PS-27. Таксономічний статус *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 підтверджено визначенням нуклеотидної послідовності генів, що кодують синтез 16S рибосомальної РНК (аналіз 16S рРНК).

Встановлено, що всі досліджувані штами здатні асимілювати вуглеводневі субстрати. *A. calcoaceticus* K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1 характеризувалися також високою швидкістю росту і високим рівнем біомаси під час культивування на середовищі з етанолом, *R. erythropolis* ЕК-1 найактивніше трансформував гідрофобні субстрати (біомаса 3,5 – 4,6 г/л) (рис. 2). Для подальших досліджень було обрано *R. erythropolis* ЕК-1, здатний до асиміляції як гідрофобних, так і гідрофільних субстратів.

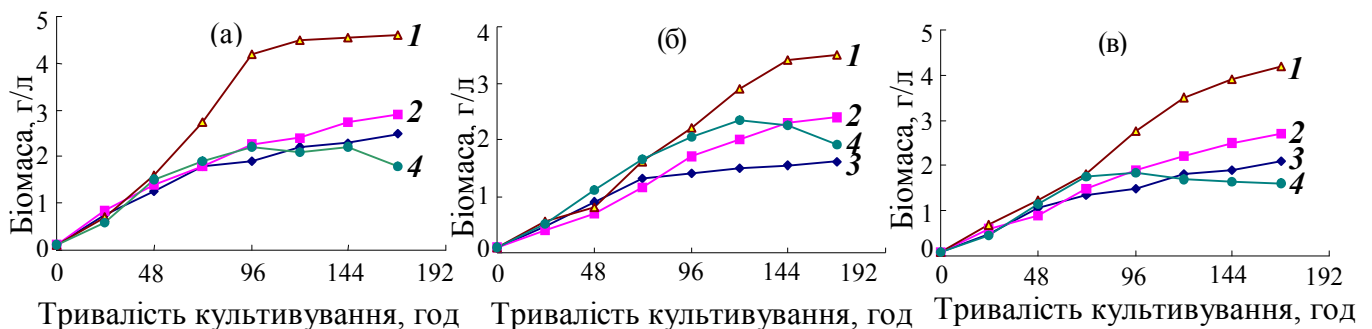


Рис. 2. Ріст нафтоокиснювальних бактерій на середовищах з рідкими парафінами (а), гексадеканом (б) та нафтою (в): 1 – *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1; 2 – *Rhodococcus* sp. N 1; 3 – *Rhodococcus* sp. N 2; 4 – *Pseudomonas* sp. PS-27.

Концентрація субстратів – 2 % (об'ємна частка).

Культивування здійснювали на середовищі 4 (1, 2, 3) і середовищі 5 (4).

З літератури відомо (de Carvalho, 2004), що бактерії роду *Rhodococcus* ростуть на етанолі, проте до теперішнього часу відсутні дані про синтез ними ПАР на цьому субстраті. Етанол як субстрат для одержання ПАР має такі переваги: він є водорозчинним і тому технологічнішим порівняно з гідрофобними субстратами; а також значно дешевшим. Результати подальших досліджень показали, що *R. erythropolis* ЕК-1 за умов росту на етанолі синтезує ПАР у незначних кількостях. Поверхневий натяг культуральної рідини (σ_s) становив 50 – 55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР*) досягала 1,1 – 1,2, а концентрація ПАР – 0,4 – 0,43 г/л, тоді як у процесі росту на гідрофобних субстратах ці показники були значно вищими. Однак під час культивування бактерій на етанолі спостерігали вищий показник індексу емульгування (E_{24}) 60 – 88 %, тоді як на гідрофобних субстратах він становив лише 23 – 56 %. Тому наступний етап наших досліджень був присвячений встановленню умов вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі, що забезпечують підвищення синтезу ПАР. Експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту у середовищі на нітратне, підвищення концентрації етанолу до 2 %, підтримання співвідношення вуглець / азот на рівні 36 : 1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР у три рази: умовна концентрація ПАР становила 3,3, кількість синтезованих ПАР – 1,2 г/л, індекс

емульгування – 85 %, який залишався на рівні 60 % навіть для розведеної у 50 разів культуральної рідини.

Хімічний склад ліпідів, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі. Дослідження хімічного складу поверхнево-активних ліпідів, виділених з культуральної рідини, супернатанту культуральної рідини і клітинної суспензії показало, що *R. erythropolis* ЕК-1 у процесі росту на етанолі синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР. У складі ПАР виявлено гліколіпіди (трегалозомоно- і трегалозодиміколати) і нейтральні ліпіди (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти, тригліцерид, міколові кислоти). У складі асоційованих з клітинами ПАР трегалозоміколати присутні у мінорних кількостях.

Слід зазначити, що ліпіди після екстракції і висушування практично не розчинялись у воді і 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,0). Їх вдалося частково розчинити при підлученні розчину до рН 9,0. Окрім того, під час обробки культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу спостерігали утворення досить стійкої емульсії. Наявність такої емульсійної фази і труднощі переводу органічного екстракту у розчин можуть свідчити про те, що ліпіди утворюють комплекс з іншими сполуками (наприклад білкової і/або полісахаридної природи). Це припущення було підтверджене як фарбуванням хроматограм нінгідрином, так і аналізом позаклітинного біосурфактанту. У його складі були виявлені нейтральні моносахариди (глюкоза, маноза, галактоза, рамноза, рибоза), глюкуронова кислота, а також білок (3,4 %) і жирні кислоти, ідентифіковані як C₁₆, C₁₈, C₂₀, C₂₂ і далі ряд піків, повторюваних через рівні проміжки часу.

Розділ 5. Вплив умов культивування на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані

Встановлено, що найнижчі значення поверхневого натягу (σ_s 30 – 39 мН/м) та найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані. Наступні дослідження показали можливість підвищення синтезу ПАР і на цьому гідрофобному субстраті шляхом оптимізації умов культивування продуцента, у тому числі з використанням методу повного факторного експерименту (ПФЕ 2³). Ці дослідження дали змогу встановити оптимальну концентрацію гексадекану (2 %) у середовищі, співвідношення С / N (49 : 1) та тривалість культивування (168 год), що забезпечують максимальний синтез ПАР.

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

Першою реакцією катаболізму вуглеводнів є їх окиснення до відповідних спиртів за участю кисню під дією ферментів монооксигеназ (Whyte, 2002). У зв'язку з цим рівень аерації (масообміну) є важливим фактором, який впливає

на утворення ПАР на гексадекани. 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 (табл. 2). Оптимальною температурою для росту *R. erythropolis* ЕК-1 є 30 °С, проте максимальний синтез ПАР спостерігали при 20 °С.

Таблиця 1

Вплив катіонів натрію на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Середовище	Джерело азоту	Показники синтезу ПАР		
		ПАР*	Індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини (1:49)	Вміст вуглеводів у культуральній рідині, г/л
2	KNO_3	2,1±0,06	49,8±1,9	0,64±0,013
	$NaNO_3$	2,8±0,09	40,3±2,6	1,30±0,042
3	KNO_3	2,4±0,09	40,8±2,5	1,04±0,031
	$NaNO_3$	4,6±0,14	38,3±2,5	1,88±0,038

Примітки:

1. Концентрація гексадекану – 1% (об'ємна частка), тривалість культивування – 168 год.
2. Концентрації KNO_3 та $NaNO_3$ еквімолярні за азотом.
3. Субстрат для емульгування – соняшникова олія.
4. Посівний матеріал вирощений на ГКА.
5. $K_s = 0,11$ г O_2 / л год.

Таблиця 2

Синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за різних режимів масообміну

K_s , г O_2 /л год	Концентрація гексадекану, %	ПАР*	Індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини		
			Без розведення	1:9	1:49
0,04	1,0	1,3±0,04	55,5±1,9	42,6±2,2	33,3±2,7
	2,0	1,6±0,06	50,9±2,4	40,3±2,0	39,4±2,5
0,11	1,0	2,4±0,07	30,3±2,6	36,8±2,0	40,8±2,5
	2,0	4,3±0,13	47,8±2,5	51,4±2,0	51,6±2,5
0,14	1,0	2,6±0,8	32,0±2,2	35,8±2,4	41,8±2,0
	2,0	4,3±0,13	37,9±2,2	56,8±1,9	56,4±2,0

Примітки:

1. Культивування продуцента здійснювали на середовищі 3, з 1,0 г/л KNO_3 упродовж 168 год.
2. Субстрат для емульгування – соняшникова олія.
3. Посівний матеріал вирощений на ГКА.

Встановлено залежність синтезу ПАР від наявності у середовищі культивування іонів заліза (табл. 3), що може свідчити про функціонування у *R. erythropolis* ЕК-1 алкангідроксилазного ферментного комплексу, який містить залізоцірकोпротеїд рубредоксин (Staijen, 1998, Whyte, 2002).

**Вплив способу приготування інокуляту на синтез
поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1**

Середовище для одержання інокуляту	Наявність іонів заліза у середовищі культивування	Показники процесу			
		Біомаса, г/л	Вуглеводи, г/л	ПАР*	Індекс емульгування (E ₂₄ , %) культуральної рідини
ГКА	-	1,3±0,04	0,79±0,03	4,3±0,15	47,8±2,1
МПА	-	1,35±0,05	0,85±0,04	4,2±0,15	49,6±2,5
Рідке мінеральне середовище 3	-	0,40±0,01	0,11±0,004	1,8±0,06	50,2±2,7
	+	1,50±0,05	1,30±0,05	4,5±0,17	51,9±2,2

Примітки:

1. Культивування здійснювали на мінеральному середовищі 3 з 2 % (об'ємна частка) гексадекану і 1 г/л нітрату калію.
2. Як джерело іонів заліза використовували FeSO₄×7H₂O – 0,001 г/л.
3. Субстрат для емульгування – соняшникова олія.
4. Тривалість культивування 168 год.
5. K_s = 0,11 г O₂/л год.

Дослідження впливу синтетичних регуляторів росту рослин ауксиноцитокінінової природи на синтез поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 показало, що ці сполуки по-різному впливали на утворення ПАР. Одні з них активізували синтез біомаси, інші – накопичення ПАР або емульгатора, у той час як деякі взагалі пригнічували і ріст бактерій, і синтез ПАР.

Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 в оптимальних умовах (концентрація гексадекану 2 %, співвідношення С/Н = 49 : 1, джерело азоту NaNO₃, наявність іонів заліза у середовищі, коефіцієнт масообміну 0,14 г O₂ / 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.

Хімічний склад ліпідів, синтезованих в різних умовах культивування на гексадекані. Вивчення хімічного складу ліпідів *R. erythropolis* ЕК-1 показало, що за умов росту на гексадекані, як і у процесі культивування на етанолі, синтезуються вільні та асоційовані з клітинами ПАР, у складі яких виявлено гліколіпіди (трегалозомоно- і трегалозодиміколати), фосfolіпіди (фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін, дифосфатидилгліцерин), нейтральні ліпіди (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір *n*-пентадеканової кислоти, тригліцерид, міколові кислоти, ефір жирної кислоти, метиловий ефір міколової кислоти та ефір *n*-пентадеканової кислоти) і слідові кількості ліпопептидів. Раніше було встановлено (див. розд. 4), що під час вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі трегалозоміколати не були виявлені (або були

зафіксовані у мінорних кількостях) у складі асоційованих з клітинами ПАР. Це явище пояснюється тим, що *R. erythropolis* ЕК-1 вирощували на гідрофільному субстраті – етанолі, а трегалозоміколати полегшують споживання гідрофобних речовин і, як правило, містяться у клітинних стінках бактерій у процесі культивування на парафінах, нафті, гексадекані.

Якісний склад ліпідів залежав від умов культивування продуцента. Найширший спектр ліпідів синтезувався під час вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 у встановлених нами оптимальних умовах культивування. Слід зазначити, що при цьому суттєво збільшувався вміст позаклітинних ліпідів і знижувалась кількість ліпідів, асоційованих з клітинами.

Розділ 6. Технологія одержання поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини

Технологія мікробних поверхнево-активних речовин на етанолі апробована на ділянці ферментації виробництва лізину ВАТ “Стиролбіотех” (м. Обухів, Київська обл.).

Технологічний процес одержання мікробних ПАР складається із допоміжних (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища) і основних робіт (приготування посівного матеріалу і біосинтез *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі БІОР-250).

Апаратурна схема одержання мікробних ПАР наведена на рис. 3.

Розділ 7. Перспективи практичного використання нафтоокиснювальних бактерій та їх поверхнево-активних метаболітів

Очищення води від нафти іммобілізованими клітинами нафтоокиснювальних бактерій. Встановлено, що *A. calcoaceticus* К-4, *N. vaccinii* К-8 і *R. erythropolis* ЕК-1 здатні рости і розмножуватися за присутності керамзиту у середовищі з нафтою. За таких умов культивування кількість залишкової нафти становила 20 – 35 % (без керамзиту 40 – 55 %); при цьому рівень біомаси практично не змінювався.

Найвищий ступінь іммобілізації на керамзиті (75 – 85 %) встановлено для *R. erythropolis* ЕК-1 і *N. vaccinii* К-8, які обрано для подальших досліджень з очищення забрудненої нафтою (100 мг/л) води на модельній лабораторній установці (див. рис. 1).

Показано, що на 24 год роботи установки спостерігали поступове підвищення до 45 – 50 мг/л вмісту нафти у воді на виході з колонки (рис. 4). Подальші експерименти показали, що за внесення біогенної добавки (діамонійфосфат, 0,01 %) спостерігали ефективну стійку роботу модельної установки упродовж 168 год: за продуктивності колонки 0,68 л/год вміст нафти у воді на виході становив 2 – 3 мг/л для *R. erythropolis* ЕК-1 і близько 12 – 16 мг/л для *N. vaccinii* К-8.

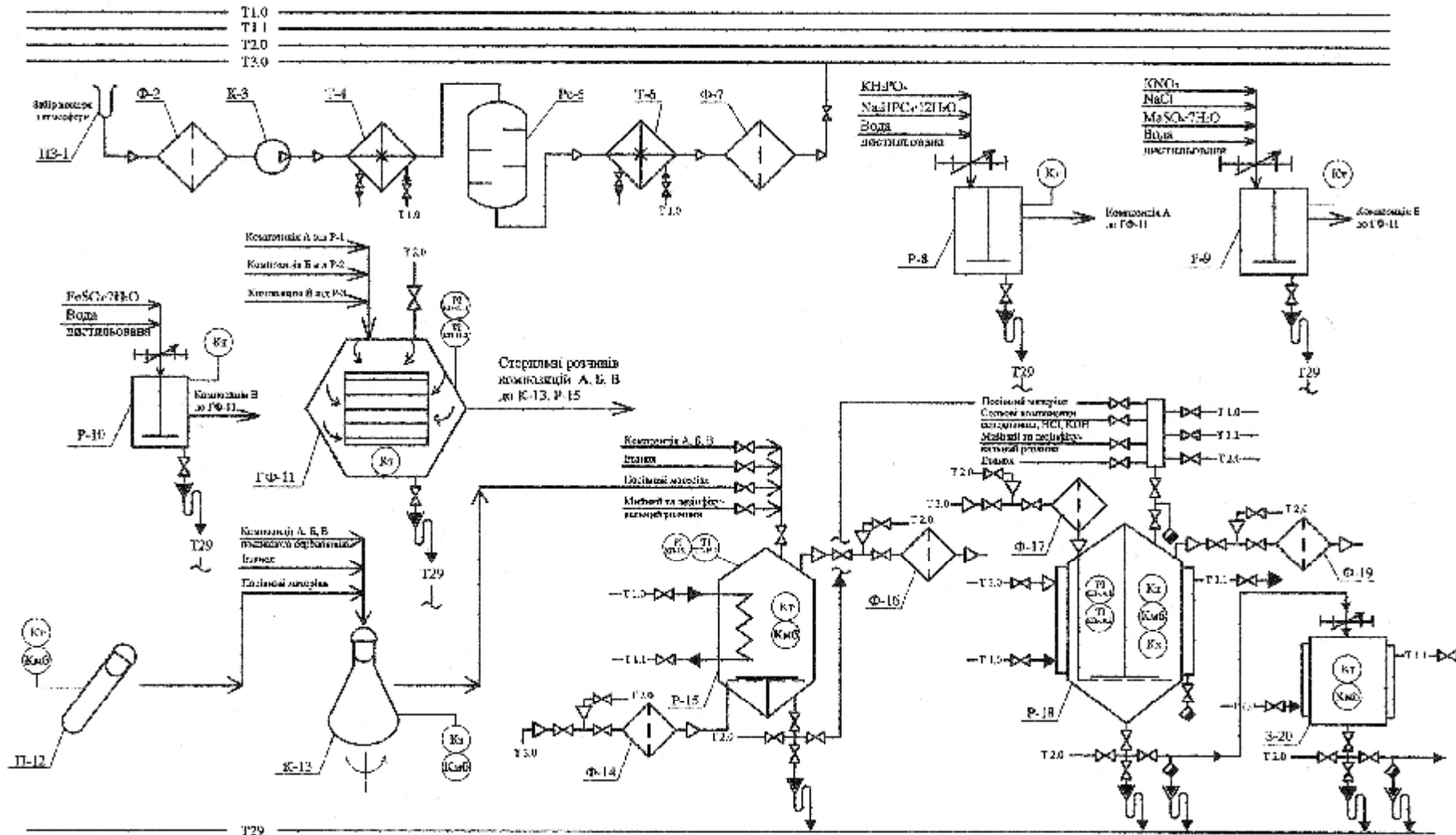


Рис. 3. Апаратурна схема одержання поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини.

ПЗ-1 – повітрязабірник, Ф-2 – фільтр грубої очистки; К-3-компресор; Т-4, Т-6 – теплообмінники; Р-5 – ресивер; Ф-7 – фільтр тонкої очистки; Р-8, Р-9, Р-10 – реактори для приготування поживного середовища; ГФ-11 – автоклав; П-12 – пробірка; К-13 – колба; Ф-14, Ф-17 – індивідуальні фільтри; Р-15 – посівний апарат; Ф-16, Ф-19 – фільтри для очищення відпрацьованого повітря; Р-18 – виробничий ферментер; З-20 – збірник.

–Т1.0– Вода питна; –Т1.1– Вода оборотна; –Т2.0– Пара; –Т3.0– Стерильне повітря; –Т29– Каналізація.

Композиція А – розчин солей KH_2PO_4 та $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; Композиція Б – розчин солей KNO_3 , NaCl , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; Композиція В – приготування розчину $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.

Проте на 192 год знову спостерігали підвищення вмісту нафти у воді на виході із колонки. Збільшення аерації до 0,1 л/л води за хв супроводжувалося підвищенням ефективності очищення води для обох досліджуваних штамів, проте залишковий вміст нафти у воді при використанні *N. vaccinii* К-8 був у 2,5 – 3,5 рази вищим, ніж для *R. erythropolis* ЕК-1. При збільшенні початкового вмісту нафти у воді до 250 мг/л (продуктивність колонки 0,68 л/год; аерація 0,1 л/л води за хв) ефективність очищення води клітинами *N. vaccinii* К-8 знижувалась і не перевищувала 90 %, у той час як для *R. erythropolis* ЕК-1 практично не змінювалась і залишалась на рівні 99,0 – 99,5 %. Таку високу ефективність очищення води від нафти іммобілізованими клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 спостерігали упродовж 30 діб безперервної роботи модельної лабораторної установки у нестерильних умовах.

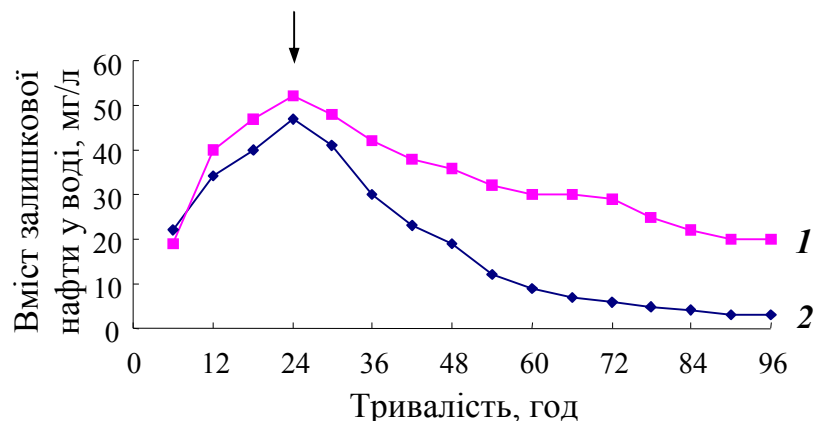


Рис. 4. Вплив діамонійфосфату на ефективність очищення води від нафти іммобілізованими клітинами *Nocardia vaccinii* К-8 (1) та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 (2).

Продуктивність колонки 0,68 л/год; Початковий вміст нафти у воді – 100 мг/л. Стрілкою показано внесення діамонійфосфату.

Використання бактерій роду *Rhodococcus* і мікробних поверхнево-активних речовин для деградації нафтових забруднень. Досліджували здатність однієї з ізольованих нами накопичувальних культур нафтоокиснювальних мікроорганізмів утилізувати сиру нафту (2 %) за присутності *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27 (рис. 5).

Вибір *R. erythropolis* ЕК-1 для проведення цих досліджень був зумовлений тим, що він характеризувався високим рівнем біомаси за умов росту на гідрофобних субстратах (див. рис. 2). Штам *Pseudomonas* sp. PS-27 є високоактивним продуцентом позаклітинних поверхнево-активних гліколіпідів (рамноліпіди) і полісахаридів альгінатної природи, яким притаманні емульгувальні властивості.

Через 72 год вирощування накопичувальної культури вміст залишкової нафти становив 24,1 % від її початкової концентрації. У процесі спільного вирощування накопичувальної культури і *R. erythropolis* ЕК-1 вміст залишкової нафти знижувався до 19,5, а за присутності ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27 – до 17,2 %. Через 192 год культивування накопичувальної культури вміст залишко-

вої нафти становив 15,8 %, а за присутності *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27 знижувався до 10,0 і 6,4 % відповідно.

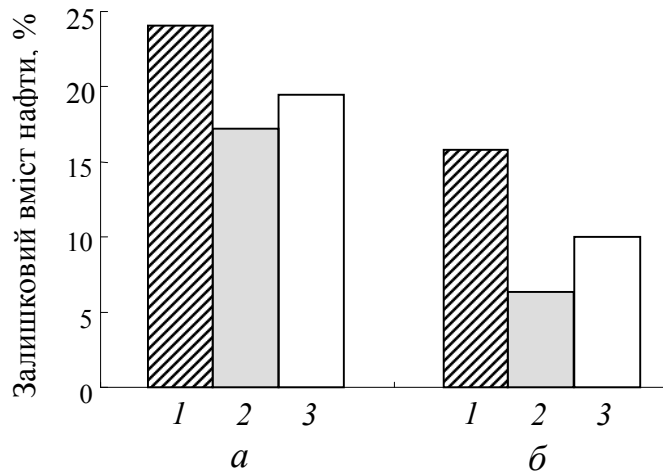


Рис. 5. Вплив *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, на ступінь деструкції нафти (% залишкової нафти) накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів упродовж 72 год (а) і 192 год (б).

1 – накопичувальна культура;

2 – накопичувальна культура і ПАР *Pseudomonas* sp. PS-27;

3 – накопичувальна культура і *R. erythropolis* ЕК-1.

Концентрація нафти – 2 % (об'ємна частка).

Таким чином, показана можливість інтенсифікації процесу деградації нафти накопичувальною культурою нафтоокиснювальних мікроорганізмів за введення *R. erythropolis* ЕК-1 і ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27.

ВИСНОВКИ

1. Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Mycobacterium* sp. К-2, *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2.

2. Встановлено здатність *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями за умов росту на гідрофільних (глюкоза, етанол) та гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах. Порівняно з відомими продуцентами ПАР штам має такі переваги: синтезує ПАР на середовищі із низьким вмістом солей (3 г/л), не потребує факторів росту, характеризується високим виходом ПАР від субстрату (до 70 %).

3. Визначено умови культивування *R. erythropolis* ЕК-1 бактерій на етанолі (концентрація субстрату 2 %, концентрація KNO_3 – 1,5 г/л, тривалість культивування – 168 год), що дали змогу у три рази підвищити синтез ПАР.

4. Максимальний синтез ПАР під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані (умовна концентрація ПАР 5,0 – 5,5; кількість синтезованих ПАР 8,0 – 8,5 г/л) спостерігався за таких умов: концентрація гексадекану 2 %, співвідношення С/Н = 49 : 1, джерело азоту NaNO_3 , наявність у середовищі іонів

заліза, коефіцієнт масообміну 0,14 г O₂ / л год, тривалість культивування 168 год.

5. Встановлено, що *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР, які за хімічною природою є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів із сполуками полісахаридно-білкової природи. Гліколіпіди представлені трегалозомоно- і трегалозодиміколатами, фосфоліпіди – фосфатидилгліцерином, фосфатидилетаноламіном, дифосфатидилгліцерином, нейтральні ліпіди – цетиловим спиртом, пальмітиноювою кислотою, метиловим ефіром *n*-пентадеканової кислоти, тригліцеридами, міколовими кислотами та ін.

6. Показано можливість очищення води, забрудненої нафтою (100 – 200 мг/л), іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 та *N. vaccinii* К-8. Ступінь очищення води від нафти за продуктивності колонки 0,68 л/год, аерації 0,1 л /л за хв та періодичному внесенні 0,01 % діамонійфосфату становив 99,5 – 99,8 %.

7. Встановлено, що за присутності у накопичувальній культурі нафтоокиснювальних бактерій *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і екзогенних ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, ступінь деструкції сирої нафти (2 %) становив 90 та 93 – 94 % відповідно.

8. Розроблено технологічну та апаратурну схему біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі. Технологія апробована у дослідно-промислових умовах ВАТ «Стиролбіотех» (м. Обухів, Київська обл.). Селекціонований штам *R. erythropolis* ЕК-1 захищено патентом України на винахід №77345 (2006 р.).

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНО ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина І.Н., Карпенко Е.В. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 5. – С 544–550 (Здобувачем особисто визначено поверхневий натяг культуральної рідини, умовну концентрацію ПАР, емульгувальні властивості, вміст вуглеводів у культуральній рідині та якісний склад ліпідів за різних умов культивування штаму-продуцента).

2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина І.Н., Грегирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С 58–63 (Здобувачем особисто визначено параметри росту накопичувальної та чистих культур нафтоокиснювальних бактерій. Здійснено іммобілізацію клітин на керамзиті та проаналізовано ступінь очищення води від нафти).

3. Пирог Т.П., Волошина І.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. – 2005. – № 6. – С 27–35. (Здобувачем особисто визначено поверхневий натяг культуральної рідини, умовну концентрацію ПАР, емульгувальні властивості, вміст

вуглеводів у культуральній рідині та якісний склад ліпідів під час культивування штаму на гексадекані).

4. *Карпенко Е.В., Вильданова-Марцишин Р.И., Щеглова Н.С., Пирог Т.П., Волошина И.Н.* Перспектива использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42, № 2. – С 175–179 (Здобувачем особисто визначено параметри росту накопичувальних культур та ступінь деградації нафти за присутності у її складі *R. erythropolis* ЕК-1 і поверхнево-активних речовин).

5. *Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshyna I.N.* Applying Keramsit-Immobilized Oil-Oxidizing Microorganisms as Water Cleansers to Help Remove Trace Petroleum Products // In: Biotechnology and the Environment Including Biogeotechnology (Ed. G.E. Zaykov). – New York: Nova Science Publishers, Inc. 2005. – P. 95–106 (Здобувачем особисто здійснено розробку модельної установки для очищення забрудненої нафтою води і підібрано оптимальні умови іммобілізації клітин на керамзиті).

6. *Т.П.Пирог, Т.А.Шевчук, І.М.Волошина.* Синтез поверхнево-активних речовин нафтоокиснювальними бактеріями *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Наукові праці НУХТ. – 2004. – Додаток до журналу № 15. – С.32–33. (Здобувачем особисто проаналізовано вплив умов культивування на синтез ПАР, визначено умовну концентрацію ПАР, емульгувальну здатність та параметри росту бактерій).

7. *Пат. 77345 UA, МКИ С12N1/02, С12P1/04, С12R1/01.* Штам бактерій *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцент поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., *Волошина І.М.*, Ігнатенко С.В. Опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11. (Здобувачем особисто досліджено здатність штаму синтезувати позаклітинні метаболіти з поверхнево-активними та емульгувальні властивості та визначення їх фізико-хімічних властивостей).

8. *І.М.Волошина, Т.П.Пирог* Синтез мікробних поверхнево-активних речовин для очищення довкілля від нафти та нафтових забруднень // Збірник матеріалів Міжн. наук.-практ. конф. «І Всеукраїнський з'їзд екологів» УНІВЕРСУМ-Вінниця. – 2006. – С. 127-131.

9. *Т.П.Пирог, Т.А.Шевчук, И.Н.Волошина.* Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от низких концентраций нефти // 2-й Межд. конгресс “Биотехнология – состояние и перспективы развития”, (10 – 14 ноября 2003 г.). М.: ЗАО “ПИК “Максима”, РХТУ им. Д.И.Менделеева, 2003. – С. 36.

10. *Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В.* Некоторые особенности синтеза поверхностно-активных веществ нефтеокисляющими бактериями // Межд. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (26-28 мая 2004 г.), Минск: ГНУ “Институт микробиологии НАН Беларуси”, 2004. – С. 96–97.

11. *Пирог Т.П., Волошина И.М., Игнатенко С.В.* Синтез поверхнево-активних речовин у різних умовах культивування штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 //

II Всеукр. наук.-практ. конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука” (6-8 жовтня 2004 р.). – Львів, 2004. – С. 50.

12. *Пирог Т.П., Волошина І.Н., Ігнатенко С.В.* Синтез поверхню-активних речовин штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і перспективи їх використання для очищення навколишнього середовища від нафтопродуктів // Міжн. конф. “Проблеми біодеструкції техногенних забруднювачів навколишнього середовища” (14-16 вересня 2005 г.). – Саратов, 2005. – С. 44.

13. *Пирог Т.П., Волошина І.Н., Ігнатенко С.В.* Синтез поверхню-активних речовин нафтоокислюючими бактеріями *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Міжн. конф. “Перспективи і проблеми розвитку промислової біотехнології в межах єдиного економічного простору країн СНГ” (25-28 травня 2005 г.). – Мінськ: РИВШ, 2005. – С. 180–181.

14. *Волошина І.М., Ігнатенко С.В., Пирог Т.П.* Використання мікробних поверхню-активних речовин для деградації нафтових забруднень // IV Націон. з'їзд фармацевтів України (28-30 вересня 2005 р.), Харків: Вид. НФаУ, 2005. – С. 334–335.

15. *Пирог Т.П., Волошина І.Н., Ігнатенко С.В.* Використання нафтоокислюючих бактерій роду *Rhodococcus* і мікробних поверхню-активних речовин для деградації нафтових забруднень // Міжн. конф. «Екологія і біологія ґрунту: проблеми діагностики і індикації» (19-21 квітня 2006 г.). – Ростов н/Д: Росиздат, 2006. – С. 393 – 395.

16. *Пирог Т.П., Волошина І.Н., Ігнатенко С.В.* Закономерності синтезу поверхню-активних речовин при вирощуванні штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гідрофобному субстраті – 10-я Міжн. Пушчинська школа-конф. мол. учених “Біологія – наука ХХІ століття” (17 – 21 квітня 2006 г.), Пушчино: изд-во Пушчинського наукового центру РАН, 2006. – С. 361 – 362.

17. *Волошина І.М., Пирог Т.П.* Вплив активаторів росту на синтез поверхню-активних речовин штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Міжн. наук. конф. “Мікробні біотехнології” (11-15 вересня 2006 р.), Одеса: Астропринт, 2006. – С. 178.

18. *Voloshina I.N., Pirog T.P.* Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain ЕК-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. Young scientists' and students' intern. sci. conf. "Modern Problems of Microbiology and Biotechnology", (28 – 31 May 2007), Odesa, 2007. – P. 112.

АНОТАЦІЯ

Волошина І.М. Розробка технології синтезу поверхню-активних речовин нафтоокислювальними бактеріями. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальності 03.00.20 – біотехнологія. Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2008.

Дисертаційна робота присвячена розробці технології одержання поверхню-активних речовин (ПАР) за допомогою *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ізольованого із забрудненого нафтою ґрунту.

Показано, що *R. erythropolis* ЕК-1 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАВ, які за хімічною природою є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів із сполуками полісахаридно-білкової природи.

Розроблена технологія ПАВ порівняно з існуючими у світі має такі переваги: низький вміст солей у середовищі культивування (3 г/л, для інших продуцентів – до 10 г/л) і відсутність мікроелементів і факторів росту, а також вищий у 1,5 – 1,8 раза вихід ПАВ від субстрату.

Встановлено можливість практичного використання мікробних ПАВ та іммобілізованих на керамзиті клітин *R. erythropolis* ЕК-1 для деградації нафтових забруднень. Ефективність очищення забрудненої нафтою (100 – 200 мг/л) води іммобілізованими клітинами *R. erythropolis* ЕК-1 становила – 99,5 – 99,8 %, а ступінь деструкції сирої нафти (2 %) накопичувальною культурою нафтоокиснювальних бактерій за присутності *R. erythropolis* ЕК-1 і екзогенних ПАВ – 90 % та 93 – 94 % відповідно.

Ключові слова: нафтоокиснювальні бактерії, *Rhodococcus erythropolis*, біотехнологія, поверхнево-активні речовини, іммобілізація, деградація нафтових забруднень.

АНОТАЦІЯ

Волошина І.Н. Разработка технологии синтеза поверхностно-активных веществ нефтеокисляющими бактериями. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. Национальный университет пищевых технологий МОН Украины, Киев, 2008.

Диссертация посвящена разработке технологии получения поверхностно-активных веществ (ПАВ) с помощью нефтеокисляющих бактерий.

Из загрязненных нефтью образцов почвы и воды выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, *Nocardia vaccinii* К-8, *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Mycobacterium* sp. К-2, *Rhodococcus* sp. N 1, *Rhodococcus* sp. N 2. Таксономический статус *R. erythropolis* ЭК-1 подтвержден определением нуклеотидной последовательностью генов 16S рибосомальной РНК.

Показана возможность синтеза ПАВ при росте *R. erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных (этанол, глюкоза) и гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) субстратах. Впервые установлена способность представителей рода *Rhodococcus* к образованию ПАВ на этаноле.

Установлены условия культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 на C₂-субстрате (концентрация этанола 2 %, концентрация KNO₃ – 1,5 г/л, время культивирования – 168 ч), позволяющие в 3 – 4 раза повысить синтез ПАВ. По химической природе ПАВ, образуемые при росте *R. erythropolis* ЭК-1 на этаноле, представляют комплекс липидов с соединениями полисахаридно-белковой природы. В составе липидов выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты) и нейтральные липиды (цетиловый спирт, пальмити-

новая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты).

Исследованы закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте *R. erythropolis* ЭК-1 на гексадекане. Установлены оптимальные для синтеза ПАВ условия культивирования продуцента на этом субстрате (концентрация гексадекана 2 %, соотношение углерод/азот 49 : 1, коэффициент массопереноса 0,11 – 0,14 г О₂ / л ч, температура 20 °С). Показана зависимость синтеза ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 от наличия в среде культивирования ионов натрия и железа. Стимулирующее влияние ионов железа на рост бактерий и синтез ПАВ может свидетельствовать о функционировании у *R. erythropolis* ЭК-1 алкангидроксилазного комплекса, содержащего железосеропротеид рубредоксин.

В составе липидов, синтезируемых *R. erythropolis* ЭК-1 на гексадекане, выявлены гликолипиды (трегалозомоно- и трегалозодикориномиколаты), фосфолипиды (фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, дифосфатидилглицерин) и нейтральные липиды (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, триглицерид, миколовые кислоты и др.). Качественный состав липидов зависел от условий культивирования *R. erythropolis* ЭК-1.

Установлена возможность практического использования микробных ПАВ и иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих бактерий для деградации нефтяных загрязнений. Показано, что применение керамзита в качестве носителя для иммобилизации бактерий позволяет интенсифицировать процесс роста и ассимиляции углеводородных субстратов. Установлена возможность очистки воды, загрязненной нефтью (100 – 200 мг/л), иммобилизованными на керамзите клетками *R. erythropolis* ЭК-1 и *N. vaccinii* К-8. Выявлена зависимость степени очистки воды от скорости ее подачи, уровня аэрации и наличия биогенной добавки.

Эффективность очистки воды от нефти иммобилизованными клетками *R. erythropolis* ЭК-1 при высокой продуктивности колонки (до 0,68 л/ч), низкой аэрации (до 0,1 л/л в мин) и периодической подаче 0,01% диаммонийфосфата составляла 99,5 – 99,8 %.

Исследована возможность интенсификации процессов деструкции нефти накопительной культурой нефтеокисляющих микроорганизмов в присутствии бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ. Показано, что степень утилизации сырой нефти (2 %) при введении в накопительную культуру активных углеводородокисляющих бактерий *R. erythropolis* ЭК-1 и экзогенных ПАВ, синтезируемых *Pseudomonas* sp. PS-27, повышалась до 90 и до 93 – 94 % соответственно.

На основе полученных результатов разработана технология получения ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1, которая по сравнению с известными в мире имеет такие преимущества: 1) возможность получения ПАВ на дешевом и технологичном субстрате – этаноле; 2) низкое содержание солей в среде культивирования (3 г/л, для других продуцентов – до 10 г/л); 3) селекционированный штамм не нуждается в дополнительном внесении факторов роста и микроэлементов;

4) *R. erythropolis* ЭК-1 синтезирует комплекс метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами; 5) возможность практического использования ПАВ в виде постферментационной культуральной жидкости включает стадии выделения и очистки конечного продукта; 6) штамм характеризуется высоким (до 70 %) выходом ПАВ от субстрата; 7) технология получения ПАВ не нуждается в дополнительном оборудовании и может быть реализована на любом биотехнологическом предприятии.

Технология апробирована в опытно-промышленных условиях ОАО «Стиролбиотех» (г. Обухов, Киевская обл.). Штамм защищен патентом Украины на изобретение №77345 (2006 г.).

Ключевые слова: нефтеокисляющие бактерии, *Rhodococcus erythropolis*, биотехнология, поверхностно-активные вещества, иммобилизация, деградация нефтяных загрязнений.

ANNOTATION

Voloshina I.M. Development of the technology of surface active substances synthesis by oil-oxidizing bacteria. – Manuscript.

The thesis is for scientific degree of the Candidate of Technical Sciences in speciality 03.00.20 – biotechnology. – National University of Food Technologies of Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2008.

The thesis is devoted to development of the technology of surface-active substances synthesis by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 that was isolated from oil-polluted soil.

It was established, that *R. erythropolis* EK-1 synthesizes free and associated with cells surface-active substances (SAS). The SAS are complex of glycolipids, phospholipids and neutral lipids with polysaccharide-protein substances.

Developed technology of surface-active substances has some advantages comparing with existing ones such as low content of mineral salts in media (3 g/l, for other producers – 10 g/l), absence of microelements and growth factors, higher (on 50 – 80 %) yield of surface-active substances from substratum.

It was established the opportunity of using microbial surface-active substances and immobilized *R. erythropolis* EK-1 cells on claydite for degradation of oil contaminations. The efficiency of oil polluted water (100 – 200 mg/l) clearing by immobilized *R. erythropolis* EK-1 cells was 99,5 – 99,8 %, level of oil (2 %) destruction by enrichment culture of oil oxidizing bacteria with *R. erythropolis* EK-1 and exogenous surface active substances were 90% and 93 – 94 % respectively.

Key words: oil oxidizing bacteria, *Rhodococcus. erythropolis* EK-1, biotechnology, surface active substances, immobilization, degradation of oil pollutions.