

Изобретение относится к микробиологии и предназначено для получения поверхностно-активных веществ, которые могут быть использованы для создания новых экологически чистых технологий в нефтедобывающей промышленности, очистки окружающей среды от углеводородных загрязнений, разработки биodeградебельных моющих средств и биозмульгаторов для парфюмерно-косметической и фармацевтической промышленности.

Известны штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, культивируемые на жидких и твердых парафинах и образующие биосурфактанты и эмульгаторы [1].

Задачей изобретения является получение новых экологически безопасных поверхностно-активных соединений посредством биосинтеза с использованием неизвестного ранее штамма микроорганизмов.

Поставленная задача решается тем, что выделен новый бактериальный штамм *Pseudomonas sp.* PS-17 (далее в тексте PS-17), способный синтезировать высокоэффективные биоПАВ и биополимер.

Разработанный штамм PS-17 отличается от вышеприведенного аналога более низкими значениями поверхностного и межфазного натяжения, высокими концентрациями образующихся поверхностно-активных продуктов и способностью утилизировать широкий спектр источников углеродного питания (в том числе промышленных отходов).

Штамм PS-17 синтезирует два поверхностно-активных внеклеточных гомологических соединения рамнолипидной природы (общая концентрация 2,0-10,0 г/л), способных эффективно снижать поверхностное (σ_s) и межфазное натяжение (σ_i) (Табл. 1).

Штамм PS-17 синтезирует также внеклеточный биополимер - полисахарид альгинатной природы (4,0-6,0 г/л) с молекулярной массой 300000 - 400000. В культуральной жидкости рамнолипидные биоПАВ и биополимер образуют комплекс, обладающий поверхностно-активными свойствами. Роль биополимера состоит в способности адсорбировать и концентрировать молекулы рамнолипидов, что придает стабильность эмульсиям с углеводородами и маслами, а также повышает нефтewытесняющие, отмывающие и другие свойства культуральной жидкости бактерий PS-17.

Микробиологическая характеристика штамма PS-17.

Разработанный штамм PS-17 выделен из нефтезагрязненного грунта Львовской области, хранится в коллекции микроорганизмов лаборатории биотехнологии ОФХ ТГИ ИФХ им. Л.В.Писаржевского НАН Украины.

1. Морфологические и культуральные свойства.

Бактерии представляют собой тонкие короткие подвижные палочки 0,4-0,5 1,8-1,9 мкм, расположенные поодиночке. Грамположительные, Спор и капсул не образует. При росте на МПА образует плоские, округлые колонии с неровным краем, прозрачные, серого цвета, В жидких средах дает равномерно мутный рост и образует внеклеточный желто-зеленый, флюоресцирующий пигмент.

2. Физиологические и биохимические свойства.

Аэроб, оптимальная температура роста 25-30°C, pH 6,8-7,2. Кислотоустойчив. Ассимилирует глюкозу, ксилозу, мальтозу, сахарозу, маннит, глицерин, этиловый спирт, жидкие парафины, лимоннокислый натрий, уксуснокислый натрий, янтарнокислый натрий. Не ассимилирует лактозу, дульцит, рамнозу, арабинозу, галактозу, и-инозит, формалин. В качестве источника азота использует нитраты, пептон, аммонийные соли, мочевины. Не нуждается в азоте аминокислот при своем развитии. Желатин не гидролизует. Индол и сероводород не продуцирует, Кровяной агар гемолизует.

Способ получения поверхностно-активных веществ культуры PS-17.

Культивирование осуществляли в условиях аэрации (200 об/мин, 0,6 V/V мин) на минеральной питательной среде, pH среды 6,8-7,2, температура 28-30°C. В качестве источников углеродного питания использовали этанол, глицерин, глюкозу, маннит, рапсовое, кокосовое и подсолнечные масла, жидкие парафины, нефть. Время культивирования - 3-5 суток.

БиоПАВ выделяли из культуральной жидкости бактерий PS-17 методом экстракции смесью растворителей (хлороформ-метанол 2:1); биополимер - осаждением тремя объемами изопропанола. Комплекс биоПАВ-полимер осаждали путем подкисления культуральной жидкости до pH 3,5. Концентрацию полученных продуктов определяли весовым методом,

Для культивирования штамма PS-17 использовали минеральную питательную среду следующего состава, г/л:

NaNO ₃	3,0
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	2,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
цитрат Na	5,0
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0,0005
CaCl ₂	0,05
Источник углерода	20,0

Пример 1. Штамм PS-17 культивируется на минеральной питательной среде вышеуказанного состава. Источник углерода: рапсовое масло (техн.) - 20,0 г/л. Время культивирования - 5 суток (круговая качалка).

Полученный продукт (культуральная жидкость) имеет следующие параметры:

$$\sigma_s = 28,8 \text{ мН/м}$$

$$\sigma_i = 0,06 \text{ мН/м}$$

$$C_{RL}^* = 7,0 \text{ г/л}$$

$$C_p^{**} = 4,0 \text{ г/л}$$

*C_{RL} - общая концентрация рамнолипидов;

**C_p - концентрация полимера

Пример 2.

По примеру 1, отличающийся тем, что в качестве источника углерода используется этанол (20,0 г/л).
Время культивирования - 4 сут.

Показатели полученного продукта:

$$\sigma_s = 29,5 \text{ мН/м}$$

$$\sigma_l = 0,07 \text{ мН/м}$$

$$C_{RL} = 3,5 \text{ г/л}$$

$$C_p = 6,0 \text{ г/л}$$

Пример 3.

По примеру 1, отличающийся тем, что в качестве источника углерода используется глюкоза (20,0 г/л).
Время культивирования - 3 сут.

Показатели полученного продукта:

$$\sigma_s = 30,1 \text{ мН/м}$$

$$\sigma_l = 0,10 \text{ мН/м}$$

$$C_{RL} = 2,3 \text{ г/л}$$

$$C_p = 3,8 \text{ г/л}$$

Пример 4. По примеру 1, отличающийся тем, что в качестве источника углерода используется глицерин (20,0 г/л).
Время культивирования - 4 сут.

Показатели полученного продукта:

$$\sigma_s = 29,5 \text{ мН/м}$$

$$\sigma_l = 0,02 \text{ мН/м}$$

$$C_{RL} = 9,5 \text{ г/л}$$

$$C_p = 6,0 \text{ г/л}$$

Примеры практического использования биоПАВ

Важнейшими свойствами биоПАВ являются: значительное снижение поверхностного и межфазного натяжения; эмульгирующая, деэмульгирующая, смачивающая способность; изменение реологии нефтей. Микробные ПАВ по своей эффективности могут превосходить синтетические аналоги. Одно из главных преимуществ биоПАВ - биodeградеability, что делает их перспективными для создания экологически безопасных технологий в различных отраслях промышленности.

Установлена эффективность поверхностно-активных препаратов штамма PS-17 для повышения нефтедобычи. Так, испытания на моделях нефтяных коллекторов показали, что поверхностно-активные биопрепараты PS-17 способны вытеснять до 70% от остаточной нефти. Важным преимуществом биоПАВ является сочетание экологической безопасности и высокой активности действия, сравнимой с синтетическими ПАВ.

Использование продуктов биосинтеза штамма PS-17 (биоПАВ и биополимера) для создания новых моющих средств основано на их способности отмывать ткани, шерсть сельскохозяйственных животных, стекло, металл и другие материалы от разнообразных загрязнений, в том числе белковых, жировых, нефтяных.

Установлена эффективность применения биоПАВ культуры PS-17 для интенсификации микробной очистки воды и грунта от загрязнений нефтепродуктами, степень очистки составляет 70-85%.

Поверхностно-активные свойства внеклеточных рамнолипидов штамма PS-17

№	Соединение	ККМ, г/л	Поверхностное натяжение*, мН/м	Межфазное натяжение* (н-гептан), мН/м	Кон-ция в культ. жидкости**, г/л
1	RL-1	50	29,5	0,020	4,200
2	RL-2	20	28,8	0,014	2,800

* Измерения проводилось для 0,5% раствора;

** Источник углеродного питания - рапсовое масло.