



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 102370

(13) U

(51) МПК

C12N 1/02 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2015 04353</b>	(72) Винахідник(и): <b>Іваниця Володимир Олексійович (UA), Гудзенко Тетяна Василівна (UA), Горшкова Олена Георгіївна (UA), Волювач Ольга Вячеславівна (UA), Бєляєва Тамара Олексіївна (UA), Конуп Ігор Петрович (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>05.05.2015</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.10.2015</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.10.2015, Бюл.№ 20</b>	(73) Власник(и): <b>ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА, вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082 (UA)</b>

**(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНОГО БІОПРЕПАРАТУ****(57) Реферат:**

Спосіб виготовлення поверхнево-активного біопрепарату полягає в культивуванні мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів нафти і нафтопродуктів з наступним введенням флокулянтів. Як мікроорганізми використовують штами антагоністів патогенних бактерій *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas* серасія ONU327, узятих у об'ємному співвідношенні 1:1:1. Як флокулянти застосовують хлорид кальцію у кількості 0,046 моль/л та перекис водню в кількості  $1 \times 10^{-6}$  моль/л.

UA 102370 U



Корисна модель належить до галузі біотехнології, зокрема до способів виготовлення поверхнево-активних біопрепаратів комплексної дії, і може бути використана у біотехнологіях екологічно безпечного очищення навколишнього середовища від хронічних нафтових забруднень; на підприємствах нафтовидобування, нафтопереробки, нафтозберігання, на залізничному транспорті, автозаправних станціях внаслідок аварійних та технологічних розливів нафти; як основа біодеградабельних миючих засобів та біоемульгаторів у фармацевтичній, парфумерній промисловості тощо.

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), тобто біосурфактанти, є не менш ефективними, ніж синтетичні аналоги, мають широкий спектр функціональної активності, мають ряд переваг: нетоксичність, стабільність фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні значень рН середовища, температур. Але саме біодеградабельність біосурфактантів робить їх на сьогоднішній день досить перспективними для створення екологічно безпечних технологій, пов'язаних з очищенням навколишнього середовища від нафтових забруднень. Способи ліквідації хронічних нафтових забруднень, що ґрунтуються на розкладанні нафтопродуктів мікроорганізмами, визнані одними з найбільш безпечних та ефективних. Бактеріальна деградація лімітується гідрофобною природою вуглеводнів, їх нерозчинністю у воді. Ефективне вирішення цієї проблеми можливе у разі продукування нафтоокиснювальними бактеріями біосурфактантів. Вони здатні диспергувати нафтопродукти або гідрофобізувати поверхні клітин, що підвищує ефективність контакту бактерій з вуглеводнями та водночас прискорює процес окиснення нафтопродуктів.

Серед широкого спектра мікроорганізмів-продуцентів ПАР відомі представники роду *Pseudomonas*-*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, які використовують для видалення гідрофобних речовин із ґрунтів.

Відомий біопрепарат (Патент RU № 2125152) для витиснення нафти, який представляє собою культуральну рідину штаму *Pseudomonas aeruginosa* S-7. Біопрепарат не забезпечує достатнього емульгування нафти, що не дозволяє вважати його вискоєфективним. Крім цього, хоча бактерії роду *P. aeruginosa* і продукують ПАР з низькими значеннями поверхневого натягу (30-32 мН/м) та високою афінністю стосовно гідрофобних органічних молекул, однак вони належать до патогенних мікроорганізмів (синьогнійна паличка), тому їх неможна використовувати як основу поверхнево-активних біопрепаратів, призначених для екологічно безпечного очищення навколишнього середовища від нафтових забруднень.

Найбільш близьким аналогом до корисної моделі за одержаним результатом, що досягається, є спосіб виготовлення поверхнево-активного біопрепарату, заснованого на одержанні продукту культивування в умовах аерації штаму PS-17 в поживному середовищі складу (г/л дистильованої води):  $\text{NaNO}_3$  - (2,0-4,0);  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  - (1,5-2,5);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - (1,0-1,5);  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - (0,2-0,7);  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  - (2,0-5,0); водорозчинний або водонерозчинний субстрат росту або суміш субстратів росту - (10-30) при рН середовища культивування, що дорівнює 6,8-7,2 і температурі 28-32° С Культивування здійснюють в умовах аерації (200 об/хв.) на поживному середовищі вище наведеного складу протягом 2-7 діб. Як джерело вуглецевого харчування використовують суміш рідких парафінів або глюкозу з етиловим спиртом. За час культивування (5-7 діб) значення поверхневого натягу бактеріальних суспензій у поживному середовищі за присутності глюкози і етилового спирту зменшувалось з  $\sim 73 \text{ мДж/м}^2$  (для дистильованої води) до 28,2 мДж/м для культуральної рідини (отриманий продукт). Вихід позаклітинних рамноліпідних ПАР склав 5-7 г/л при індексі емульгування 80-85 % (патент України на винахід № 71792А від 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004).

Основним недоліком найближчого аналога є: ускладненість технологічного процесу отримання бактеріальних суспензій з поліпшеними поверхнево-активними властивостями, тобто одержання біосурфактантів відбувається за умов аерації (культивують на круговій качалці протягом 2-7 діб). При введенні у водний розчин в значній кількості органічних речовин, наприклад спиртів, поверхневий натяг самих розчинів, навіть за відсутністю мікроорганізмів, суттєво зменшується (до 28-35 мДж/м<sup>2</sup>) - цю поправку не враховано. Біопрепарат, складений із одного бактеріального штаму, не здатний розкласти широкий спектр нафтових вуглеводнів і процес деструкції є тривалішим.

Актуальною задачею екобіотехнології залишається пошук нафтоокиснювальних мікроорганізмів, які не є патогенними, здатні продукувати у спеціально підібраному поживному середовищі біосурфактанти і можуть бути використані як основа вискоєфективних біопрепаратів у технології очищення морської води і ґрунту від нафтових вуглеводнів і смолисто-асфальтенових речовин.

Задачею, на вирішення якої спрямована запропонована корисна модель, є розробка способу виготовлення поверхнево-активного біопрепарату на основі асоціації непатогенних

штамів мікроорганізмів-деструкторів нафти і антагоністів патогенних бактерій за спрощеною технологією (без додаткової стадії аерації) та з використанням мінімальної кількості джерел вуглецю та азоту.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб виготовлення поверхнево-активного біопрепарату, який полягає в культивуванні мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів нафти і нафтопродуктів з наступним введенням флокулянтів, згідно з корисною моделлю, як мікроорганізми використовують штами антагоністів патогенних бактерій *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas seracia* ONU327, узятих у об'ємному співвідношенні 1:1:1, а як флокулянти застосовують хлорид кальцію у кількості 0,046 моль/л та перекис водню в кількості  $1 \times 10^{-6}$  моль/л.

Пропонований спосіб виготовлення поверхнево-активного біопрепарату на основі асоціації непатогенних нафтоокиснювальних мікроорганізмів здійснюють наступним чином.

Виготовляють поживне середовище складу, що містить (г/л дистильованої води):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -3;  $\text{NaCl}$ -5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -1; глюкоза - 2, з рН 7,0-7,2 за температури 28-30 °С. Культивують у поживному середовищі окремо штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327. Культивування проводять без додаткової аерації протягом 3-5 діб. За даний час внаслідок утворення біосурфактантів значно поліпшуються поверхневі властивості бактеріальних суспензій, складених із окремих штамів бактерій.

Про здатність мікроорганізмів продукувати біосурфактанти судять по зниженню поверхневого натягу рідких бактеріальних культур [ $\sigma$ (БК), мДж/м<sup>2</sup>] відносно дистильованої води [ $\sigma$ (H<sub>2</sub>O), мДж/м<sup>2</sup>] і поживного середовища за відсутності мікроорганізмів [ $\sigma$ (ПС), мДж/м<sup>2</sup>] та по емульгувальній здатності біосурфактантів. З метою визначення типу біосурфактантів - позаклітинні або клітинно-зв'язані, бактеріальні клітини відділяють центрифугуванням (6500 об/хв. протягом 20 хв) та вимірюють поверхневий натяг супернатантів.

Значення поверхневого натягу ( $\sigma$ , мДж/м) вимірюють методом відриву пластинки з поверхні рідини (метод Вільгельмі) з точністю  $\pm 0,5$  мДж/м<sup>2</sup> за температури 25 °С.

Поверхнево-активний біопрепарат готують змішуванням бактеріальних суспензій із штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327, взятих у об'ємному співвідношенні 1:1:1, після чого вводять для утворення біофлоків перекис водню і хлорид кальцію в кількості  $1 \times 10^{-6}$  моль/л і 0,046 моль/л відповідно. Під дією перекису водню і хлориду кальцію суттєво пришвидшується процес утворення в однорідній суспензії біофлоків (за відсутності хімеагентів агрегація бактерій протікає значно повільніше і відбувається під дією полісахаридних комплексів клітинної стінки). При цьому різко збільшується загальна адсорбційна ємність препарату.

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

Дослідження по розробці способу виготовлення поверхнево-активного біопрепарату на основі непатогенних штамів мікроорганізмів-деструкторів нафти і нафтопродуктів з використанням мінімальної кількості джерел їх харчування проводили у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Як об'єкти дослідження використовували непатогенні штами бактерій роду *Pseudomonas*, що попередньо були виділені та відібрані, і на сьогоднішній день зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327. Штами *P. fluorescens* ONU328 та *P. maltophilia* ONU329 виділені з морського середовища, а *P. seracia* ONU327 - з забрудненого нафтопродуктами ґрунту. Попередні лабораторні дослідження показали [Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* І Гудзенко Т.В. та ін. // Мікробіологія і біотехнологія. - 2013. - № 4. - С. 72-80], що перелічені вище штами мають досить високу нафтоокиснювальну здатність по відношенню до сирої нафти.

Результати по тензометричному дослідженню поверхнево-активних властивостей рідких бактеріальних культур (БК) та їх супернатантів (С) представлені в таблиці.

Таблиця

Штам	P. fluorescens ONU328		P. maltophilia ONU329		P. seracia ONU327		Асоціація 1:1:1		Контроль (ПС)
Поверхневий натяг	БК	С	БК	С	БК	С	БК	С	
$\sigma$ (БК), мДж/м	46,8	49,8	47,9	48,9	54,9	58,7	42,2	47,1	67,9
$\sigma$ (ПС) - $\sigma$ (БК), мДж/м <sup>2</sup>	21,1	18,1	20,0	19,0	13,0	9,2	27,7	20,8	0,0
$\sigma$ (H <sub>2</sub> O) - $\sigma$ (БК), мДж/м	25,2	22,2	24,1	23,1	17,1	13,3	29,8	24,9	4,1
K(H <sub>2</sub> O)-0,2028									

Як видно із даних таблиці, бактерії роду *Pseudomonas* продукують переважно позаклітинні біосурфактанти. Супернатанти, відділені від бактеріальних клітин центрифугуванням, мають поверхнево-активні властивості. При дослідженні поверхневих властивостей бактеріальних культур і їх супернатантів враховували поправку на поживне середовище за відсутністю мікроорганізмів. Додатково встановлено, що за наявності значної кількості органічних речовин (наприклад, пептону і дріжджового екстракту в кількості 10 і 5 г/л відповідно) поверхневий натяг їх водних розчинів значно зменшується (до 51,2 мДж/м<sup>2</sup>).

Експериментально підтверджено: при використанні асоціації, складеної із суспензій бактеріальних культур *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327, взятих у об'ємному співвідношенні 1:1:1, їх поверхневі властивості у спеціально підбраному поживному середовищі поліпшуються порівняно з поверхневими властивостями суспензій, складених із окремих штамів мікроорганізмів. Емульгувальні властивості супернатантів, оцінені за індексом емульгування ( $E_{24}$ , %) по відношенню до соняшникової олії, високі (~ 75 %).

Встановлена ефективність використання поверхнево-активного біопрепарату на основі синергетично діючої асоціації непатогенних штамів *P. fluorescens*, *P. seracia*, *P. maltophilia* (1:1:1 по об'єму) для інтенсифікації біотехнологічного очищення морської води та ґрунту від широкого спектра нафтопродуктів. При цьому ступінь очищення склав близько 90 % при вихідній концентрації нафтопродуктів 15-42 г/кг ґрунту.

Використання спеціально підбраного поживного середовища для непатогенних бактерій роду *Pseudomonas* дозволяє спростити технологію отримання поверхнево-активного біопрепарату та зменшити матеріальні витрати на його приготування. Крім цього в пропонуваній корисній моделі при оцінці поверхневих властивостей біопрепарату враховано порівняно з прототипом поправку на поживне середовище за відсутністю мікроорганізмів та збільшено кількість штамів біохімічно-активних мікроорганізмів, що супроводжується прискоренням процесу деструкції широкого спектра нафтових вуглеводнів і смолисто-асфальтенових речовин. Цінністю запропонованого способу виготовлення поверхнево-активного біопрепарату поліфункціональної дії є те, що у ньому використані саме ті мікроорганізми (*P. fluorescens*, *P. seracia*, *P. maltophilia*), які здатні цілком розкласти нафту та нафтопродукти, вони не є патогенними, не мають антагоністичних властивостей один щодо одного і є антагоністами патогенних бактерій, що забруднюють навколишнє середовище.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення поверхнево-активного біопрепарату, який полягає в культивуванні мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів нафти і нафтопродуктів з наступним введенням флокулянтів, який **відрізняється** тим, що як мікроорганізми використовують штами антагоністів патогенних бактерій *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329, *Pseudomonas seracia* ONU327, узятих у об'ємному співвідношенні 1:1:1, а як флокулянти застосовують хлорид кальцію у кількості 0,046 моль/л та перекис водню в кількості  $1 \times 10^{-6}$  моль/л.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601