

УДК 576.8.095.3:628.35

© В. Н. Шевкопляс<sup>1</sup>, М. И. Бойко<sup>2</sup>

**КОНВЕРСИЯ ТЯЖЕЛЫХ ФРАКЦИЙ СЫРОЙ НЕФТИ МИКРОМИЦЕТАМИ  
РОДОВ *MORTIERELLA* (СОЕМ.), *PENICILLIUM* (LINK EX FR.),  
ЕЁ АНАЛИЗ МЕТОДАМИ ИК- И <sup>1</sup>Н-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ**

<sup>1</sup>Институт физико-органической химии и углекислоты им. Л. М. Литвиненко НАН Украины  
83114, г. Донецк, ул. Р. Люксембург, 70

<sup>2</sup>Донецкий национальный университет; 83050, м. Донецк, вул. Щорса, 46

*Шевкопляс В. Н., Бойко М. И.* Конверсия тяжелых фракций сырой нефти микромицетами родов *Mortierella* (Соем.), *Penicillium* (Link ex Fr.), её анализ методами ИК- и <sup>1</sup>Н-ЯМР- спектроскопии. – Показана возможность использования микромицетов родов и *Mortierella* и *Penicillium* для конверсии тяжелых фракций сырой нефти (ТФСН). Обнаружена взаимосвязь между физиологической активностью микромицетов, количеством ТФСН в питательной среде и способностью микромицетов ее утилизировать. Методом ИК-спектроскопии показано, что конверсия ТФСН микромицетами приводит к разрушению ее структуры, и это сопровождается изменениями оптической плотности (Е) полос поглощения. Методом <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектроскопии определено соотношение  $N_{ар}/N_{ал}$  протонов в остатках ТФСН после конверсии микромицетами. Предполагается, что конверсия ТФСН идет по пути окислительной деструкции с участием экзобелков микромицетов

*Ключевые слова:* микромицеты родов *Mortierella* и *Penicillium*, носитель, ТФСН, физиологическая активность, конверсия, ИК- и <sup>1</sup>Н-ЯМР-спектроскопия, механизмы.

### **Введение**

Естественное самоочищение загрязненных участков земной поверхности и воды от нефти является очень длительным процессом, в этой связи возникает необходимость проведения направленного поиска микроорганизмов, способных деструктировать углеводороды различных классов. В работе L. Pacheco с соавторами [20] показано, что грибы *Penicillium* и *Polisporum* могут расти на питательной среде с агаром, которая содержала добавки тяжелой фракций сырой нефти (ТФСН). Установлено, что нефть и нефтепродукты могут существенно влиять на численность, биомассу и жизнеспособность почвенной микрофлоры [1]. Наиболее резистентными видами к нефтяному загрязнению оказались представители родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Mucor* [5-7].

Основным методом очистки от нефти и нефтепродуктов на сегодня является механический сбор с поверхности воды и суши. Эффективность очистки поверхности почвы увеличивается, если используются различные биообогащенные бактериальные субстраты [3-13]. Для очистки водной поверхности от нефти применяют различные носители [10]. Однако все используемые носители предназначены для иммобилизации на своей поверхности микроорганизмов-деструкторов, способных усваивать нефтяные фракции, выкипающие до температуры 350°C. Все фракции нефти, выкипающие свыше 350°C, являются высокомолекулярными соединениями и непригодны для конверсии микроорганизмами. Для того чтобы микроорганизмы могли эффективно деструктировать такие нефтяные фракции, необходимо использовать специальные носители [15]. Не исключено, что такой подход позволит более эффективно использовать в процессе биоконверсии как высоковязкие фракции сырой нефти, которые образуются при перегрузке танков на нефтетерминалах, так и отходы нефтеперегонных заводов. Все эти нефтеотходы не перерабатываются, а только складываются и пока не имеют практического применения.

Целью данной работы было изучить возможность использования полимерного носителя (POVDA) для улучшения конверсии высокомолекулярных фракций сырой нефти (ТФСН) микромицетами родов *Penicillium* и *Mortierella* и установить ее наличие с помощью методов ИК- и <sup>1</sup>Н ЯМР-спектроскопии.

### **Материал и методы исследования**

Чистые культуры микромицетов родов *Penicillium* (*Penicillium* sp. 3-98, *Penicillium* sp. 8-98) и *Mortierella* (*Mortierella* sp. 5A) выделены из угольного шлама илонакопителя

обогащительной фабрики "Трудовская" г. Донецка и использованы в экспериментах по конверсии тяжелой фракции сырой нефти (ТФСН).

Все микромицеты выращивали на жидкой питательной среде, содержащей картофельно-сахарозный углерод (КСС) [11]. Чтобы установить способность микромицетов деградировать ТФСН, к приготовленным питательным средам добавляли 2-80 г/л добавки ТФСН. Стерилизацию питательных сред проводили в автоклаве АГ-1 при давлении 1,5 атм в течение 45 мин. Инокуляцию и рост микромицетов проводили в колбах (100 мл) с питательной средой 50 мл в условиях поверхностной культуры при температуре 22°C. Продолжительность эксперимента составила 60 суток. Определение накопления биомассы грибами осуществляли весовым методом, количества экзобелка в культуральной жидкости (КЖ) методом Бредфорда [2], количества оставшегося остатка ТФСН весовым методом, рН культуральной жидкости устанавливали с помощью ионметра ЭВ-74. Полученные цифровые результаты подвергали статистической обработке [8].

В экспериментах по биоконверсии использовали ТФСН (смывочные нефтяные отходы), остающиеся в нефтяных танках после перегрузки сырой нефти, содержащие 10-18% ароматических соединений. Для повышения эффективности процесса конверсии ТФСН микромицетами использовали полимерный носитель POVDA, на который наносили ТФСН в количестве 2,0 г на 50 мл питательной среды [14]. Эти условия эксперимента обеспечивали хороший контакт ТФСН с питательной средой и таким образом позволяли повысить конверсию ТФСН микромицетами. Способность микромицетов деструктировать ТФСН определяли по остатку ТФСН (г) на носителе. Общую конверсию ТФСН рассчитывали по формуле:  $Q = m_2/m_1 \times 100\%$ , где  $m_1$  – количество ТФСН, внесенной в питательную среду, г;  $m_2$  – остаток ТФСН на носителе после эксперимента, г.

По окончании эксперимента деградированный остаток ТФСН отделяли от носителя POVDA экстракцией толуолом с последующим выпариванием его при 30°C под вакуумом, а затем анализировали физико-химическими методами. Запись ИК-спектров исходной ТФСН и деградированной ТФСН микромицетами проводили на спектрофотометре UR-20 в области полос поглощения 3800-600 см<sup>-1</sup>. Идентификацию полос поглощения ИК-спектров проводили по данным [6-17]. Для количественной оценки изменений, происходящих в структуре ТФСН при ее конверсии микромицетами, использовали методику [12]. <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры исходной ТФСН и после ее конверсии микромицетами записывали на спектрометре "Gemini-200" с рабочей частотой 200 МГц в растворе дейтеро-хлороформа (CDCl<sub>3</sub>). Для этого брали 25 мг исследуемого образца и растворяли в 0,6 мл CDCl<sub>3</sub>. В качестве внутреннего эталона использовали тетраметилсилан (ТМС). Интерпретацию химических сдвигов протонов <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров в исследуемых образцах проводили по данным работы [4].

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены результаты, характеризующие влияние различных добавок ТФСН на физиологическую активность микромицета *Mortierella sp. 5A* и его способность осуществлять конверсию ТФСН.

Из табл. 1 видно, что увеличение в питательной среде количества добавки ТФСН на носителе POVDA оказывает негативное влияние на накопление биомассы *Mortierella sp. 5A*. Определено, что добавка ТФСН в концентрации 2,0 г/л вызывала наибольшее накопление биомассы гриба. При внесении в среду культивирования *Mortierella sp. 5A* добавки ТФСН в количестве 24-80 г/л отмечалось минимальное накопление биомассы и появление только отдельных колоний микромицета.

Таблиця 1

Конверсія добавок ТФСН мікроміцетом *Mortierella sp. 5A* при росте на КСС

Добавка		Биомасса, г/л	Кол-во экзобелка в КЖ, мг/мл	Остаток ТФСН на носителе, г/л	Остаток ТФСН в КЖ, г/л	Конверсия ТФСН, %
Носитель POVDA, г/л	ТФСН, г/л					
20	2,0	4,90	6,1	0,3	-	85,0
40	4,0	3,80	24,3	0,8	-	79,4
40	8,0	3,20	71,4	2,0	-	75,0
40	12,0	2,40	64,3	3,9	1,6	62,5
40	16,0	1,30	17,9	5,8	2,4	55,0
80	24,0	0,30	9,3	11,2	2,8	42,5
80	32,0	0,10	7,0	18,7	4,6	27,2
120	40,0	0,08	5,4	28,6	6,0	13,5
160	50,0	0,06	3,6	41,8	7,4	7,8
200	60,0	0,03	2,9	55,2	8,0	5,2
240	80,0	0,02	1,3	78,4	9,5	2,0

Нахождение в питательной среде добавки ТФСН в количестве 4,0-12,0 г/л повышает способность *Mortierella sp. 5A* продуцировать экзобелки в КЖ по сравнению с остальными вариантами опыта (см. табл. 1). По-видимому, при этих условиях проведения эксперимента микромицет способен пройти стадию адаптации и образовать новые ферментные системы для расщепления ТФСН и обеспечения определенного роста гриба. Дальнейшее увеличение количества добавки (16,0 г/л и более) в питательной среде оказывало ингибирующее влияние на рост *Mortierella sp. 5A*, снижало его физиологическую активность (накопление биомассы, количество экзобелка в КЖ) и как следствие – уменьшалась способность гриба деградировать ТФСН. Максимальная конверсия ТФСН *Mortierella sp. 5A* достигалась при количестве добавки в питательной среде 2,0 г/л. Следовательно, можно сделать вывод, что добавки ТФСН 2,0-4,0 г/л являются наиболее приемлемыми для конверсии грибом *Mortierella sp. 5A*.

Анализ остатков ТФСН после конверсии микромицетами на КСС, содержащей 4,0 г/л добавки, методом ИК-спектроскопии показал, что они имели полосы поглощения, характеризующие наличие в их структуре алифатических, ароматических и функциональных кислородсодержащих групп. На ИК-спектре появлялись полоса слабой интенсивности при 925 см<sup>-1</sup> (замещение вокруг бензольного кольца) и полоса поглощения при 1500 см<sup>-1</sup> (колебания С-С бензольного кольца), что может указывать на другой путь конверсии ТФСН *Mortierella sp. 5A* по сравнению с *Penicillium sp. 3-98* и *Penicillium sp. 8-98*. Количественная оценка изменений в структуре ТФСН после ее конверсии микромицетами приведена в табл. 2.

Таблиця 2

Оптическая плотность (*E*) полос поглощения ИК-спектров деградированной добавки ТФСН (4,0 г/л) микромицетами на КСС

Варианты опыта	E полос поглощения см <sup>-1</sup>							
	3350	2950	1630	1600	1450	1060	725	69
ТФСН-контроль-(исходный)	0,10	0,64	-	0,14	0,53	0,10	0,12	0,12
<i>Penicillium sp. 3-98</i>	0,21	0,52	0,13	0,17	0,42	0,10	0,10	0,15
<i>Penicillium sp. 8-98</i>	0,14	0,40	0,14	0,18	0,35	0,14	0,10	0,13
<i>Mortierella sp. 5A</i>	0,31	0,67	0,20	0,25	0,61	0,23	0,15	0,19

Как следует из данных табл. 2, наблюдается незначительное увеличение *E* полосы при 1600 см<sup>-1</sup> (С-О-связь карбонильной группы в ароматических кислотах, кетонах и ненасыщенных альдегидах). Это предполагает протекание реакций первичного окисления концевых СН<sub>3</sub>-групп в алифатических цепях ТФСН. Увеличение *E* полос поглощения при

1300-1150  $\text{см}^{-1}$  (С-О-связь карбоновых кислот, эфиров и фенолов) предполагает дальнейшее протекания реакций окисления ТФСН ферментными системами микромицетов. Это дает возможность предположить, что осуществляются как реакции дальнейшего окисления альдегидов до карбоновых кислот, так и непосредственное окисление алифатических цепей в структуре ТФСН.

В свою очередь это приводит к образованию дополнительного количества водородных связей (ОН-группы) между отдельными фрагментами структуры ТФСН за счет внедрения ОН-групп в межуглеродное пространство алифатических цепей. На это указывает и усиление *E* полосы поглощения при 3350  $\text{см}^{-1}$ . Усиление полосы поглощения при 1600  $\text{см}^{-1}$  может происходить за счет валентных колебаний С=С-связи ароматического кольца, а также за счет присутствия ОН-групп вокруг бензольного кольца и Н-связи в бензольном кольце. Также для всех ИК-спектров имеет место усиление *E* полос поглощения в области 2950-2850  $\text{см}^{-1}$  (симметрические и асимметрические колебания С-Н-связи алифатических  $\text{CH}_2$ - и  $\text{CH}_3$ -групп), что предполагает некоторое разрушение структуры ТФСН ферментными системами микромицетов. Некоторое снижение *E* полос поглощения при 1450-1380  $\text{см}^{-1}$  для ИК-спектров остатков ТФСН после конверсии *Penicillium sp. 3-98* и *Penicillium sp. 8-98* предполагает разрыв С-С-связи алифатических цепей и отрыв концевых  $\text{CH}_3$ -групп. Из табл. 2 также видно, что имеет место изменение в ароматической части добавки ТФСН. Так, несколько увеличивается *E* полос поглощения в области 870-725  $\text{см}^{-1}$  (С-Н-связь ароматического кольца) и при 690-660  $\text{см}^{-1}$  (замещение в ароматическом кольце). Исходя из полученных результатов, можно предположить, что конверсия ТФСН микромицетами может идти по пути окислительной деструкции.

Для оценки изменений, которые происходили в структуре ТФСН после ее конверсии грибом *Mortierella sp. 5A* на питательной среде, содержащей глюкозу, проанализированы ИК-спектры остатков ТФСН (2,0-16,0 г/л). Обнаружено, что ИК-спектр остатка ТФСН (2,0 г/л) имеет новую полосу поглощения при 1550  $\text{см}^{-1}$  (карбокисильные группы) и при 1270  $\text{см}^{-1}$  (ароматические эфиры, главным образом С-О-связь в гидроксильных и фенольных группах) и 1120  $\text{см}^{-1}$  (С-О-связь фенольных гидроксидов). На ИК-спектре остатка ТФСН (4,0 г/л) обнаружены новые полосы поглощения при 1220-1100  $\text{см}^{-1}$  (область поглощения связи С-О-фенольных гидроксильных групп) и полосы поглощения при 1650  $\text{см}^{-1}$  (связь С=О хинонов, соединенных водородными мостиками) [9]. По-видимому, способность *Mortierella sp. 5A* окислять добавку ТФСН будет максимальной тогда, когда ТФСН в питательной среде будет находиться в концентрации 2,0-4,0 г/л. Количественные изменения, происходящие в структуре ТФСН после её конверсии грибом *Mortierella sp. 5A*, представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Оптическая плотность (*E*) полос поглощения ИК-спектров деградированной ТФСН грибом *Mortierella sp. 5A* на КСС**

ТФСН, г/л	<i>E</i> полос поглощения, $\text{см}^{-1}$								
	3350	2950	1700	1660	1450	1150	1060	725	690
ТФСН-контроль	0,10	0,64	0,12	-	0,42	0,11	0,10	0,12	0,12
2,0	0,22	0,48	0,14	0,24	0,36	0,16	0,19	0,23	0,19
4,0	0,31	0,67	0,20	0,20	0,50	0,20	0,21	0,15	0,19
8,0	0,16	0,73	0,17	0,18	0,53	0,18	0,16	0,13	0,17
12,0	0,10	0,79	0,15	0,16	0,55	0,15	0,10	0,10	0,13
16,0	0,10	0,86	0,14	0,14	0,57	0,15	0,10	0,10	0,12
24,0	0,10	0,90	0,12	0,11	0,60	0,15	0,10	0,10	0,11

Из табл. 3 видно, что способность *Mortierella sp. 5A* деградировать ТФСН зависит от её количества в питательной среде. Подсчитано, что наибольшее усиление  $E$  полос поглощения ИК-спектров в области функциональных кислородсодержащих групп характерно для 2,0-8,0 г/л ТФСН и имеет тенденцию к снижению с увеличением количества добавки в питательной среде. Увеличение количества добавки в питательной среде до 12,0-16,0 г/л практически не оказывает влияния на изменение  $E$  полос поглощения ИК-спектров при  $3350\text{ см}^{-1}$ ,  $1700\text{ см}^{-1}$ ,  $1310-1150\text{ см}^{-1}$  и  $1060-1030\text{ см}^{-1}$ , что, возможно, связано с подавлением физиологической активности *Mortierella sp. 5A* и выражается в уменьшении количества деградированной ТФСН. Также наблюдается увеличение  $E$  полос поглощения ИК-спектра, характеризующих алифатическую часть ТФСН. Увеличение  $E$  полос поглощения ИК-спектра при  $2950-2850\text{ см}^{-1}$  и  $1450-1380\text{ см}^{-1}$  предполагает усиление деформационных колебаний в алифатической части ТФСН и последующий их разрыв по С-С-связи. Наибольшие изменения  $E$  полос поглощения в ароматической части ТФСН ( $870-725\text{ см}^{-1}$  и  $690-660\text{ см}^{-1}$ ) наблюдались тогда, когда ТФСН в питательной среде составляли 2,0-4,0 г/л. Данные табл. 3 показывают, что добавка ТФСН в питательной среде в количестве от 2,0 до 8,0 г/л является наиболее оптимальной для ее конверсии грибом *Mortierella sp. 5A*.

При проведении экспериментов по конверсии ТФСН обнаружено, что в культуральной жидкости в период роста *Mortierella sp. 5A* накапливалось большое количество мелкодисперсных, смолистых включений, которые являются продуктами конверсии ТФСН. Продукты конверсии ТФСН были отделены от КЖ растворением в толуоле с последующим отделением их от самого толуола и обозначены как фракция А – 12,0-24,0 г/л и фракция В – 32,0-80,0 г/л, соответственно, а затем проанализированы методом ИК-спектроскопии. Анализ фракций А и В показал, что они имеют интенсивную полосу поглощения при  $1650\text{ см}^{-1}$  (С-О-связь карбоксиллов). Интенсивность полосы поглощения при  $1650\text{ см}^{-1}$  также может увеличиваться, если образуется водородная связь между кислотным гидроксидом и хиноном [21] и/или арил-кетонном [19]. Наличие полосы поглощения при  $1650\text{ см}^{-1}$  на ИК-спектрах остатков ТФСН (2,0-4,0 г/л) после роста *Mortierella sp. 5A* предполагает, что конверсия ТФСН идет за счет окислительных реакций, в результате чего в культуральной жидкости накапливаются окисленные остатки нефти.

В табл. 4 приведены результаты ИК-спектроскопии продуктов конверсии ТФСН (фракции А и В), которые были экстрагированы с носителя POVDA в КЖ после роста *Mortierella sp. 5A*. Видно, что фракции А и В имеют полосы поглощения при  $3350$ ,  $1700$  и  $1600\text{ см}^{-1}$ ,  $1310-1150\text{ см}^{-1}$ ,  $1060-1030\text{ см}^{-1}$ , интенсивность которых в 2-3 раза выше, чем для исходной ТФСН. Это предполагает, что продукты конверсии ТФСН являются более окисленными, а также имеют много функциональных кислородсодержащих групп. Увеличение  $E$  полос поглощения при  $2950-2850\text{ см}^{-1}$  и  $1450-1380\text{ см}^{-1}$  указывает, что конверсия нефти идет по пути разрушения алифатических цепей в ее структуре. При рассмотрении  $E$  полос поглощения, характеризующих ароматическую часть фракций А и В, можно отметить, что интенсивность полос поглощения при  $870-725\text{ см}^{-1}$  и  $690-660\text{ см}^{-1}$  увеличивается незначительно, а интенсивность полосы поглощения при  $3030-3010\text{ см}^{-1}$  (С-Н-связи ароматического кольца) остается без изменения по сравнению с исходной ТФСН. Исходя из полученных результатов можно предположить, что продукты конверсии ТФСН (фракция А и В) в большей степени характеризуют структурные изменения в алифатической составляющей ТФСН, чем в ароматической.

Методом  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопии обнаружено, что все исследуемые образцы добавок ТФСН после их конверсии микромицетами имеют сигналы химических сдвигов алифатических ( $\delta = 0,5-3,0$  м.д.) и ароматических ( $\delta = 6,0-8,5$  м.д.) протонов, а также протоны гидроксильных фенольных групп ( $\delta = 6,0-5,0$  м.д.).

Таблиця 4

**Оптическая плотность (E) полос поглощения ИК-спектров деструктированной ТФСН, собранной из КЖ (фракция А – 12,0-24,0 г/л и фракция В – 32,0-80,0 г/л), микромицетом *Mortierella sp. 5A* на КСС**

Варианты опыта	E полос поглощения, см <sup>-1</sup>								
	3350	2950	1700	1660	1600	1450	1270	1060	690
ТФСН-контроль	0,10	0,64	0,12	-	0,14	0,42	-	0,10	0,12
Фракция А	0,39	0,45	0,30	0,38	0,34	0,45	0,22	0,36	-
Фракция В	0,32	0,42	0,30	0,30	0,30	0,41	0,21	0,27	-

На основании данных литературы [4] и анализа <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров остатков ТФСН после их конверсии, можно принять следующую интерпретацию химических сдвигов: 1) сигнал протонов метильной группы в алифатических фрагментах C<sub>ал</sub>-CH<sub>3</sub>; 2) наиболее интенсивный и разрешенный мультиплет протонов метиленовой группы -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-; 3) интенсивный широкий сигнал с несколькими максимумами, которые можно отнести к протонам метильных и метиновых групп, присоединенных к ароматическим, олефиновым и кислородсодержащим углеводородам; 4) интенсивный широкий сигнал с несколькими максимумами можно отнести к протонам замещенных и незамещенных ароматических углеводородов.

Сравнивая <sup>1</sup>H-ЯМР-спектры исходной ТФСН и деградированной ТФСН после роста гриба *Mortierella sp. 5A*, можно заключить, что происходит снижение интенсивности сигналов химических сдвигов протонов в области 0,5-3,0 м.д. Также обнаружено, что интенсивность сигналов в области химических сдвигов при 1,65-3,0 м.д. имеет тенденцию к снижению.

По результатам анализа <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии проведено количественное определение доли ароматических и алифатических протонов в исследуемых образцах ТФСН после их конверсии. Определение доли алифатических и ароматических протонов проводили путем соизмерения интегральных интенсивностей сигналов <sup>1</sup>H-ЯМР-спектров в области алифатических и ароматических протонов (табл. 5).

Таблиця 5

**Соотношение N<sub>ар</sub>/N<sub>ал</sub> протонов в остатках ТФСН после конверсии *Mortierella sp. 5A* на КСС по данным <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии**

Варианты опыта	Содержание протонов, %		Соотношение N <sub>ар</sub> /N <sub>ал</sub>
	N <sub>ар</sub>	N <sub>ал</sub>	
ТФСН - контроль	11,7	88,2	0,13
Деградированный остаток ТФСН (4,0г/л)	15,5	84,5	0,18
Фракция А	14,5	85,5	0,17

Из табл. 5 видно, что деградированная грибом ТФСН имела больше ароматических структур (15,5%), а соотношение N<sub>ар</sub>/N<sub>ал</sub> протонов увеличивается до 0,18 по сравнению с исходной ТФСН. Также подсчитано, что соотношение N<sub>ар</sub>/N<sub>ал</sub> у добавки ТФСН (4,0 г/л) после ее конверсии и у собранной из КЖ фракции А практически одинаково.

В настоящее время существует точка зрения, согласно которой биоконверсия углеродного субстрата микроорганизмами может идти по трем основным направлениям: действие энзимов, основных метаболитов и микробиологических хелаторов [16], в результате чего имеет место разрыв различных связей в углеродной структуре. Результаты, приведенные в этой статье, предполагают, что деградация ТФСН идет по пути окислительной деструкции. Данные табл. 2 иллюстрируют, что после роста микромицетов на питательной среде с добавкой ТФСН (4,0 г/л) наблюдаются изменения интенсивности полос поглощения ИК-спектров. Материалы табл. 3 демонстрируют взаимосвязь между

количеством добавки ТФСН в питательной среде и  $E$  полос поглощения ИК-спектров после деградации нефти *Mortierella sp. 5A*. Из табл. 1 и 3 видно, что интенсивность полос поглощения ИК-спектров остатков ТФСН зависит от количества добавки ТФСН в питательной среде и от способности *Mortierella sp. 5A* продуцировать экзобелки в КЖ. Можно сделать вывод о том, что вышеуказанная взаимосвязь свидетельствует о способности микромицетов продуцировать специальные ферментные системы в питательную среду для окисления и последующей конверсии углеродного субстрата ТФСН. По данным работы [18], в состав ферментных систем, продуцируемых микромицетами в КЖ, входят оксидазы и пероксидазы, содержащие активный кислород и способные переносить его на поверхность углеродного субстрата.

Для выяснения предполагаемого механизма конверсии ТФСН грибами проанализированы ИК-спектры экзобелков микромицета *Mortierella sp. 5A*, произрастающего на питательной среде Чапека с глюкозой (20,0 г/л – контроль) и на среде с ТФСН (16,0 г/л). Обнаружено, что ИК-спектры экзобелка имели хорошо разрешенные полосы поглощения при 3400, 2920-2850, 1630, 1100, 870, 610 и 540  $\text{см}^{-1}$ . Однако ИК-спектр экзобелка (добавка ТФСН) характеризовался большей интенсивностью полосы поглощения при 1100  $\text{см}^{-1}$  (колебания С-О-связи в ангидридах, лактонах, эфирах, фенолах, эпоксидах и карбонил-карбонатах), и как следствие увеличивалась интенсивность полос поглощения при 3400 и 1630  $\text{см}^{-1}$  (образование водородной связи между фенол-фенольным и фенол-карбоксылным гидроксиллом). При уменьшении интенсивности полосы поглощения при 1380  $\text{см}^{-1}$  и её смещении до 1400  $\text{см}^{-1}$  (наличие высокого замещения в ароматическом кольце) также имеет место. В ИК-спектре экзобелка с добавкой ТФСН появлялись новые полосы поглощения при 1000  $\text{см}^{-1}$  (С-О-связь кетонов и деформационные колебания ОН-связи спиртов) и при 930 и 820  $\text{см}^{-1}$  (С-Н-связь ароматического кольца). По-видимому, полосы поглощения при 1100  $\text{см}^{-1}$  и при 3400 и 1630  $\text{см}^{-1}$  могут характеризовать наличие активного кислорода в структуре экзобелка, который проявлял высокие окислительные свойства. Анализ ИК-спектра показал, что питательная среда Чапека, содержащая добавку ТФСН, способна влиять на физиологическую активность *Mortierella sp. 5A*. Очевидно, микромицет продуцировал ферментные системы, содержащие большое количество активного кислорода для конверсии ТФСН. Сравнительная количественная оценка интенсивности полос поглощения ИК-спектров экзобелков, полученных при росте гриба *Mortierella sp. 5A* на питательной среде Чапека с глюкозой (20,0 г/л – контроль) и на среде Чапека, содержащей добавку ТФСН (16,0 г/л), приведена в табл. 6. Видно, что  $E$  полоса поглощения при 1100  $\text{см}^{-1}$  увеличивалась в 1,6 раза, а полосы поглощения при 3400 и 1630  $\text{см}^{-1}$  – в 1,8-1,3 раза по сравнению с полосами ИК-спектра экзобелка без добавки ТФСН (контроль).

Таблица 6

**Оптическая плотность ( $E$ ) полос ИК-спектров экзобелков гриба *Mortierella sp. 5A*, произрастающего на питательной среде Чапека, содержащей глюкозу (20 г/л)**

Варианты опыта	$E$ полосы поглощения, $\text{см}^{-1}$								
	3400	2920	1630	1400	1380	1100	1000-930	870	610
Экзобелок гриба без ТФСН	0,32	0,10	0,20	-	0,28	0,58	-	0,13	0,15
ТФСН, 16,0 г/л	0,46	0,10	0,26	0,18	-	0,91	0,35	0,14	0,21

### Выводы

Использование носителя POVDA позволяет удерживать добавку нефти на своей поверхности, и это увеличивает площадь контакта ТФСН с питательной средой, что позволяет эффективно её деградировать микромицетам. Наибольшая конверсия ТФСН *Mortierella sp. 5A* наблюдается, когда её количество в картофельно-сахарозной среде (КСС) составляет 2,0-8,0 г/л. Анализ ИК- и <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии остатков ТФСН после конверсии микромицетами показал, что разрушение ТФСН идет по пути окислительной деструкции.

### Список литературы

1. Головченко А. В. Влияние нефти на численность биомассы и жизнестойкость грибов в верхних торфяниках / А. Головченко, Л. Полянская // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 111-117.
2. Дарбе А. Практическая химия белка / А. Дарбе. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
3. Емцев В. Т. Микробная биоремедиация нефтезагрязненных почв / В. Т. Емцев, О. В. Селицкая, Д. С. Станкевич // Тр. Междунар. конф. "Проблемы микробиологии и биотехнологии". – Минск: Беларусь, 1998. – С. 167–168.
4. Жунке А. Ядерный магнитный резонанс в органической химии / А. Жунке. – М.: Мир, 1974. – 176 с.
5. Иванов В. Н. Активность некоторых эколого-трофических групп микроорганизмов при загрязнении чернозема обыкновенного углеводородами нефти / В. Н. Иванов, А. Н. Дульгеров, Е. В. Стабникова // Микробиол. журн. – 1994. – Т. 56, № 6. – С. 58-65.
6. Кинделл Д. Прикладная инфракрасная спектроскопия / Д. Кинделл. – М.: Мир, 1970. – 376 с.
7. Киреева Н. А. Микромицеты почв, загрязненных нефтью и фитотоксичность / Н. А. Киреева, Н. Ф. Галямзянова, А. М. Мифтахова // Микология и фитопатология. – 2000. – Т. 34, № 1. – С. 36–41.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1980. – 291 с.
9. Ларина И. К. Физические и физико-химические методы исследования молекулярного строения углей / И. К. Ларина, В. И. Касаточкин // Химия твердого топлива. – 1969. – № 4. – С. 49–56.
10. Использование микробов-деструкторов в очистке сточных вод от нефтепродуктов / Н. И. Павленко, В. В. Изжуева, Л. М. Ханкина, Т. Н. Карпова, Л. В. Головкин // Микробиол. журн. – 1998. – Т. 60, № 2. – С. 85–90.
11. Семенов С. М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник / С. М. Семенов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
12. Смит А. Прикладная инфракрасная спектроскопия / А. Смит. – М.: Мир, 1982. – 327 с.
13. Стабникова Е. В. Скрининг носителя для бактерий, очищающих почву от нефтяных загрязнений / Е. В. Стабникова // Микробиол. журн. – 1998. – Т. 60, № 2. – С. 85-90.
14. Шевкопляс В. Н. Использование носителя нефтяной добавки POVDA для повышения метаболизирующей способности микромицетов / В. Н. Шевкопляс, М. И. Бойко // Проблемы екології та охорони природи техногенного регіону. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – Вип. 5. – С. 158–164.
15. Шевкопляс В. Н. Состояние и перспективы применения биологического способа утилизации отходов нефтехимии и углехимии / В. Н. Шевкопляс, В. И. Саранчук // Сб. науч. тр. Междун. конф. "Экологические проблемы городов и рекреационных зон". – Одесса, 1999. – С. 151–159.
16. Characterization of liquefaction / solubilization mechanisms of Spanish coals newly isolated microorganisms / F. Laborda, M. F. Redondo, N. Luna, I. F. Menisteral // Proceedings of 8<sup>th</sup> Intern. Conf. on Coal Science. – Oviedo, Spain, 1995. – V. 3. – P. 1387–1390.
17. Landias P. In situ examination of coal macerals oxidation by micro-FT-i.r.-spectroscopy / P. Landias, A. Rochdi // Fuel. – 1993. – V. 72, N 10. – P. 1393–1401.
18. Biodegradation of hard coal and its organic extract by selected microorganism / B. Osipiowicz, A. Jablonski, S. Jasienko, A. Rymkiewicz // Fuel. – 1994. – V. 73, N 12. – P. 1858–1862.
19. Painter P. C. Application of Fourier-transform infrared spectroscopy to the characterization of fractional coal liquid / P. C. Painter, M. M. Coleman // Fuel. – 1979. – V. 58, N 4. – P. 301–308.



20. *Enzymatic dissolution* of preswollen coal and heavy crude oil / L. Pacheco, W. Higuera, A. Zamora, A. Villagas, J. M. Rincon / Proceedings of 9<sup>th</sup> Intern. Conf. on Coal Science. – Essen, Germany, 1997. – V. 3. – P. 1611–1614.

21. *Robin P. L.* Contribution of molecular water in the infrared spectra of kerogen and coal / P. L. Robin, Rouxhet // Fuel. – 1976. – V. 55, N 7. – P. 177–483.

**Шевкопляс В. М., Бойко М. І.** Конверсія важких фракцій сирої нафти мікроміцетами родів *Mortierella* (Coem.) і *Penicillium* (Link ex Fr.) та її аналіз методами ІЧ- і <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії. – Показано можливість використання мікроміцетів родів *Mortierella* і *Penicillium* для деградації важких фракцій сирої нафти (ВФСН). Визначено взаємозв'язок між фізіологічною активністю мікроміцетів і кількістю доданої ВФСН у живильні середовища та здатністю мікроміцетів у певній мірі змінювати структуру нафти, що підтверджується методами ІЧ- та <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопії. Припускається, що конверсія ВФСН йде шляхом окислювальної деструкції за участю екзобілків мікроміцетів.

*Ключові слова:* міксоміцети родів *Mortierella* і *Penicillium*, конверсія, ВФСН, ІЧ- та <sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопія, механізми.

**Shevkoptyas V. N., Boyko M. I.** Conversion of raw oil tailings by micromycetes *Mortierella* (Coem.), *Penicillium* (Link ex Fr.) and its analysis by infrared and NMR spectroscopy methods. – The possibility of using of the carrier (POVDA) to convert the heavy crude oil (HCO) by micromycetes species *Penicillium* and *Mortierella* has been studied. Relationship between the physiological activities of micromycetes, yield loaded addition to nutrient medium and ability of micromycetes to utilize HCO have been found. Methods of i.r.- and <sup>1</sup>H-n.m.r.-spectroscopy for elucidation of the HCO conversion mechanism by micromycetes were used. It has been suggested that the HCO conversion trended to the pathway of oxidative destruction with micromycetes extracellular proteins participating.

*Key words:* micromycetes *Mortierella*, *Penicillium*, carrier, heavy crude oil (HCO), physiological activity, degradation, i.r.- and <sup>1</sup>H-n.m.r.-spectroscopy, mechanisms.