



Vilniaus universitetas

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos  
II kurso studentė

Valentina MATUŠOVA

## **Naftos produktų degradacijos nustatymas ir proceso optimizavimas**

Magistro darbas

Darbo vadovas  
dr. Audrius Gegeckas

Vilnius  
2020

# **Naftos produktų degradacijos nustatymas ir proceso optimizavimas**

**Darbas atliktas Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biomokslų institute**

Darbą atliko: **Valentina Matušova** .....

Darbo vadovas: **dr. Audrius Gegeckas** .....

## TURINYS

DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS.....	5
ĮVADAS.....	6
1 LITERATŪROS APŽVALGA .....	8
1.1 Nafta ir naftos produktai .....	8
1.2 Angliavandenilių grupės .....	8
1.2.1 Sotieji angliavandeniliai .....	9
1.2.2 Aromatiniai angliavandeniliai .....	9
1.2.3 Dervos.....	10
1.2.4 Asfaltenai.....	11
1.3 Angliavandenilių biodegradacija .....	12
1.3.1 Aerobinės degradacijos mechanizmas.....	12
1.3.1.1 Sočiųjų angliavandenilių aerobinės degradacijos mechanizmas.....	13
1.3.1.2 Aromatinių angliavandenilių aerobinės degradacijos mechanizmas .....	14
1.3.2 Anaerobinės degradacijos mechanizmas .....	15
1.3.2.1 Sočiųjų angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmas.....	15
1.3.2.2 Aromatinių angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmas.....	16
1.4 Mikroorganizmų konsorciumas .....	18
1.5 Biosurfaktantai.....	19
1.5.1 Biosurfaktantų klasifikacija.....	20
2 MEDŽIAGOS IR METODAI .....	22
2.1 Darbe naudotos medžiagos, terpės ir prietaisai.....	22
2.1.1 Darbe naudotos medžiagos.....	22
2.1.2 Bakterijų auginimo terpės.....	22
2.1.3 Mikroorganizmai .....	23
2.2 Darbe naudoti metodai .....	23
2.2.1 Mitybinių terpių ruošimas .....	23
2.2.2 Mikroorganizmų išskyrimas .....	24
2.2.3 Išskirtų izoliatų atranka .....	24
2.2.4 Suminės DNR skyrimas .....	24
2.2.5 DNR elektroforezė agarozės gelyje.....	25
2.2.6 Polimerazės grandininė reakcija.....	26
2.2.7 PGR produktų analizė.....	26
2.2.8 Dujų chromatografijos metodas.....	26

2.2.8.1	Mėginių kultivavimas ir paruošimas dujų chromatografijos metodui .....	27
2.2.8.2	Angliavandenilių kiekio nustatymas dujų chromatografijos metodu.....	27
2.2.9	Degradacijos proceso optimizavimas .....	27
2.2.10	Biosurfaktantų aktyvumo nustatymas .....	28
3	REZULTATAI .....	29
3.1	Mikroorganizmų gebančių degraduoti naftą paieška.....	29
3.1.1	Atrinktų izoliatų identifikavimas.....	29
3.2	Angliavandenilių degradacijos nustatymas.....	33
3.2.1	Degradacijos proceso optimizavimas .....	34
3.2.2	Mikroorganizmų augimo analizė.....	37
3.3	Biosurfaktantų aktyvumo nustatymas.....	39
3.3.1	Emulsifikacijos aktyvumo nustatymo metodas .....	39
3.3.2	Naftos išstūmimo metodas.....	39
4	REZULTATŲ APTARIMAS .....	41
5	NUMATYTI EKSPERIMENTAI .....	44
5.1	Naftos ar jos produktų degradacijos optimalių sąlygų nustatymas.....	44
5.1.1	Skirtingo naftos kiekio panaudojimas degradacijos procesui optimizuoti .....	44
5.1.2	Pridėtinių medžiagų naudojimas ir angliavandenilių degradacija.....	45
5.2	Biosurfaktantų analizė .....	45
5.2.1	Plonasluoksnės chromatografijos metodas.....	45
	IŠVADOS.....	47
	SANTRAUKA .....	48
	SUMMARY .....	49
	PADĖKA.....	50
	LITERATŪROS ŠALTINIAI .....	51

## DARBE NAUDOTOS SANTRUMPOS

BTEX – aromatiniai angliavandeniliai: benzenas, toluenas, etilbenzenas ir trys ksileno izomerai;

CLB – ląstelių lizės buferinis tirpalas (angl. *cell lysis buffer*);

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

GC-FID – dujų chromatografija – liepsnos jonizacijos detektorius (angl. *gas chromatograph – flame ionization detector*);

LJD – liepsnos jonizacinis detektorius;

OT<sub>600</sub> – optinis tankis, kuris matuojamas esant 600 nm bangos ilgiui;

PGR – polimerazės grandininė reakcija;

PPT – baltymų precipitacijos buferinis tirpalas (angl. *protein precipitation buffer*);

TAE buferinis tirpalas – tirpalas, sudarytas iš Tris, acto rūgšties ir EDTA;

TLC – plonasluoksnė chromatografija (angl. *thin layer chromatography*);

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;

TSA – triptono sojos agaras (angl. *tryptone soya agar*);

TSB – triptono sojos sultinys (angl. *tryptone soya broth*);

UV – ultravioletinė spinduliuotė.

## ĮVADAS

Viena didžiausių aplinkos problemų yra angliavandenilių tarša, kurios dažniausia priežastis yra įvairios naftos gavybos ir perdirbimo veiklos. Antropogeninė veikla, natūralūs nuotėkiai ir atsitiktiniai išsiliejimai ypač svarbūs aplinkos kokybei. Šių cheminių medžiagų poveikis sveikatai yra plačiai žinomas (Uzair *et al.*, 2016). Užterštumas naftos angliavandeniliai yra labai pavojingas tiek sausumos tiek vandens aplinkai, turi įtakos tiek stuburiniams, tiek bestuburiams gyvūnams (Selvam ir Thatheyus, 2018). Dirvožemio užterštumas naftos angliavandeniliais šiuo metu kelia didelį susirūpinimą bei mokslininkų susidomėjimą, dėl jo keliamos grėsmės dirvožemio ekosistemai, požeminio vandens kokybei ir žmonių sveikatai.

Pastaraisiais metais mokslinės pastangos buvo nukreiptos į perspektyvių naftos angliavandeniliais užteršto dirvožemio atkūrimo strategijų kūrimą (Siles ir García-Sánchez, 2018). Ieškoma naujesnių, pigesnių ir saugesnių technologijų, peržengiančių įprastus mechaninius ir cheminius metodus, kurie yra ne tik brangūs, bet ir ne visada efektyvūs. Bioremediacija – tai dideliu potencialu pasižyminti technologija, kuri mikroorganizmų pagalba teršalus paverčia i nekenksmingus metabolizmo proceso junginius (Uzair *et al.*, 2016). Bakterijų gebėjimas degraduoti naftos angliavandenilius buvo plačiai ištirtas ir panaudotas įvairių užterštų vietų valymui, kurias paveikė skystų angliavandenilių išsiliejimai (Selvam ir Thatheyus, 2018).

Beveik 175 bakterijos, archėjos ir eukariotiniai mikroorganizmai geba skaidyti angliavandenilius į anglies dioksidą ir vandenį. Natūralioje aplinkoje naftos produktų skaidyme dalyvauja ne vienos rūšies bakterijos, o įvairūs mikroorganizmų konsorciumai (Selvam ir Thatheyus, 2018).

Dėl bioremediacijos didelio potencialo, ieškoma vis naujų mikroorganizmų ir jų konsorciumų, gebančių efektyviai degraduoti naftą ar jos produktus. Siekiama atrasti optimaliausias mikroorganizmų degradacijos sąlygas bei kaip jas pritaikyti ir panaudoti natūralioje aplinkoje. Todėl šiame darbe buvo ieškoma mikroorganizmų pasižyminčių naftos ar jos produktų degradacija bei siekiama atrasti šio proceso optimaliausias sąlygas.

### **Darbo tikslas**

Naftos degradacijos nustatymas atrinktuose mikroorganizmuose ir proceso optimizavimas.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Išskirti tikslius mikroorganizmus ir nustatyti šių mikroorganizmų filogenetinę priklausomybę.
2. Modifikuoti ir pritaikyti naftos degradacijos nustatymo metodiką.
3. Nustatyti optimalias naftos ar jos produktų degradacijos sąlygas.
4. Įvertinti paviršiaus aktyviųjų medžiagų biosintezės potencialą atrinktuose mikroorganizmuose.

# 1 LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Nafta ir naftos produktai

Nafta, susidariusi iš organinių medžiagų terminio skilimo metu per milijonus metų, yra išgaunama iš po žemės ir gabenama į naftos perdirbimo gamyklas, kur ji distiliuojama, norint išgauti įvairius naftos produktus (Varjani, 2017). Distiliacija – tai sudedamųjų dalių atskyrimas iš skysto mišinio, garinimo ir kondensavimo metu. Distiliavimas yra skirtingų tipų: paprastas distiliavimas, vakuuminis distiliavimas, distiliavimas garais, daugiapakopis distiliavimas, pirolitinis distiliavimas ir katalitinis distiliavimas (Kinsara ir Demirbas, 2016). Pagal naftos frakcijų virimo temperatūrą, jos skirstomos į naftos produktus:

- Dujiniai angliavandeniliai (iki 50 °C)
- Benzinas (iki 180 °C)
- Dyzelinis kuras (150–205 °C)
- Žibalas (205–260 °C)
- Lengvosios naftos dujos (260–315 °C)
- Sunkiosios naftos dujos (315–425 °C)
- Tepalinė alyva (> 400 °C)
- Mazutas (425–600 °C) (Kinsara ir Demirbas, 2016).

## 1.2 Angliavandenilių grupės

Nafta yra sudaryta iš kelių tūkstančių skirtingų organinių medžiagų. Pagrindė tai angliavandenilių mišinys su nedideliu kiekiu tokių elementų kaip: deguonis, azotas, siera bei metalai, tokiais kaip nikelis, vanadis ir chromas. (Chandra *et al.*, 2013; Fingas, 2015; Varjani ir Upasani, 2017). Žaliavinės naftos sudėtis yra:

- Anglies: 83–87%
- Vandenilio: 10–14%
- Sieros: 0,05–6%
- Azoto: 0,1–2%
- Deguonies: 0,05–1,5%

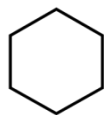
Angliavandeniliai gali būti tiesios arba šakotos struktūros, prisotinti arba neprisotinti alifatiniai, alicikliniai, aromatiniai ir poliaromatiniai junginiai (Van Hamme *et al.*, 2003; Varjani ir Upasani, 2017). Angliavandenilius, kaip naftos pagrindines sudedamąsias dalis,



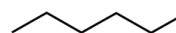
galima suskirstyti į keturias kategorijas: 1) sotieji angliavandeniliai (alkanai, izoalkanai ir cikloalkanai), 2) aromatiniai angliavandeniliai (mono ir policikliai aromatiniai junginiai), 3) dervos ir 4) asfaltenai (Fingas, 2015; Varjani, 2017; Grigiškis, 2011; Speight, 2014; Varjani ir Upasani, 2017).

### 1.2.1 Sotieji angliavandeniliai

Sotieji angliavandeniliai tai grupė, kurios junginiai sudaryti tik iš anglies ir vandenilio, neturi dvigubų jungčių ar aromatinių savybių. Jie pilnai „prisotinti“ vandeniliu. Sotieji angliavandeniliai yra tiesios grandinės, šakotos arba ciklinės (Fingas, 2015). Pagal cheminę struktūrą jie skirstomi į alkanus (parafinus) (1.2 pav.) ir cikloalkanus (1.1 pav.) (Abbasian *et al.*, 2015).



**1.1 pav.** Cikloalkanų grupės monomeras – cikloheksanas.

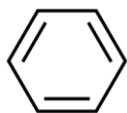


**1.2 pav.** Alkanų grupės monomeras – heksanas.

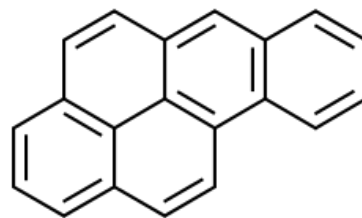
Didesnės molekulinės masės angliavandeniliai, kurių anglies grandinė yra didesnė nei 18 anglies atomų, yra vadinami vaškais (Fingas, 2015). Sotieji angliavandeniliai žaliaviniėje naftoje sudaro didžiausią procentą sudedamųjų dalių (Varjani, 2017).

### 1.2.2 Aromatiniai angliavandeniliai

Aromatiniai angliavandeniliai – tai cikliniai organiniai junginiai, turintys nesočiąją aromatinę grupę – dažniausiai benzeno žiedą. Aromatiniai angliavandeniliai skirstomi į: 1) monociklinius aromatinis angliavandenilius, prie jų priskiriami: benzenas (1.3 pav.), toluenas, etilbenzenas ir trys ksileno izomerai (BTEX) (Costa *et al.*, 2012; Fingas, 2015; Varjani, 2017), 2) policikliniai aromatiniai angliavandeniliai (PAH) (Chandra *et al.*, 2013; Varjani, 2017). Šiai angliavandenilių grupei priklauso junginiai susidedantys mažiausiai iš dviejų benzeno žiedų (Fingas, 2015). Policikliniai aromatiniai angliavandeniliai, kurie sudaryti iš dviejų ar trijų žiedų, tokie kaip naftalenas (du žiedai), fenantrenas ir antracenas (trys žiedai), vadinami mažą molekulinį svorį turinčiais arba lengvaisiais policikliniai aromatiniai angliavandeniliai. PAH, kurie sudaryti iš keturių ir daugiau žiedų, tokių kaip pirenas ir chrizenas (keturi žiedai), fluorantenas ir benzopirenas (penki žiedai) (1.4 pav.), vadinami didelę molekulinę masę turinčiais arba sunkiaisiais PAH (Varjani, 2017). Benzenas ir jo alkilinti dariniai bei policikliniai aromatiniai junginiai ir jų alkilinti dariniai sudaro apie kelis procentus naftos sudėties (Fingas, 2015).



**1.3 pav.** Monociklinis aromatinis angliavandenilis – benzenas.

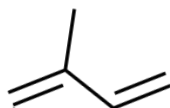


**1.4 pav.** Policiklinis aromatinis junginys – benzopirenas.

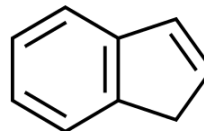
### 1.2.3 Dervos

Dervų frakcija naftoje susideda iš polinių molekulių turinčių azoto, sieros, deguonies bei kai kurių metalų (Ni, V, Fe). Dervose yra aromatinių junginių, turinčių ilgą alkilo grandinę (Varjani, 2017). Ši frakcija gerai tirpsta lengvuosiuose alkanuose, tokiuose kaip n-heptanas ir n-pentanas (Chandra *et al.*, 2013; Varjani, 2017), bet netirpsta skystame propane (Demirbas ir Taylan, 2016). Dervų H/C santykis yra nuo 1,2 iki 1,7 kartų didesnis nei asfaltenų. Dervos yra mažesnės molekulinės masės nei asfaltenai (Demirbas ir Taylan, 2016), tačiau didesnės nei sotieji ir aromatiniai angliavandeniliai (Boukir *et al.*, 2001).

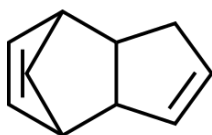
Dervos yra klasifikuojamos į trys pagrindinės grupės: alifatinės dervos, aromatinės dervos ir diciklopentadienes dervos (DCPD) (Zohuriaan–Mehr ir Omidian, 2000; Sugihara, 2014). Alifatinių dervų pagrindą sudaro C5 anglies atomai, prie kurių prisijungę parafino junginiai bei įvairus kiekis pilarileno (1,3-pentadieno), izopreno ir įvairių monoolefinų. Paveiksle 1.5 pavaizduotas vienas iš daugelio alifatinių dervų grupės monomeras – izoprenas. Aromatinių dervų pagrindą sudaro C9 anglies atomai. Joje yra didelis kiekis poliindenu, kurie yra polimerizuoti iš indeno, vieno iš pagrindinių C9 anglies atomų žaliavų. 1.6 paveiksle pavaizduotas aromatinės dervų grupės monomeras indenas (Sugihara, 2014).



**1.5 pav.** Alifatinės dervų grupės monomeras izoprenas.



**1.6 pav.** Aromatinės dervų grupės monomeras indenas.

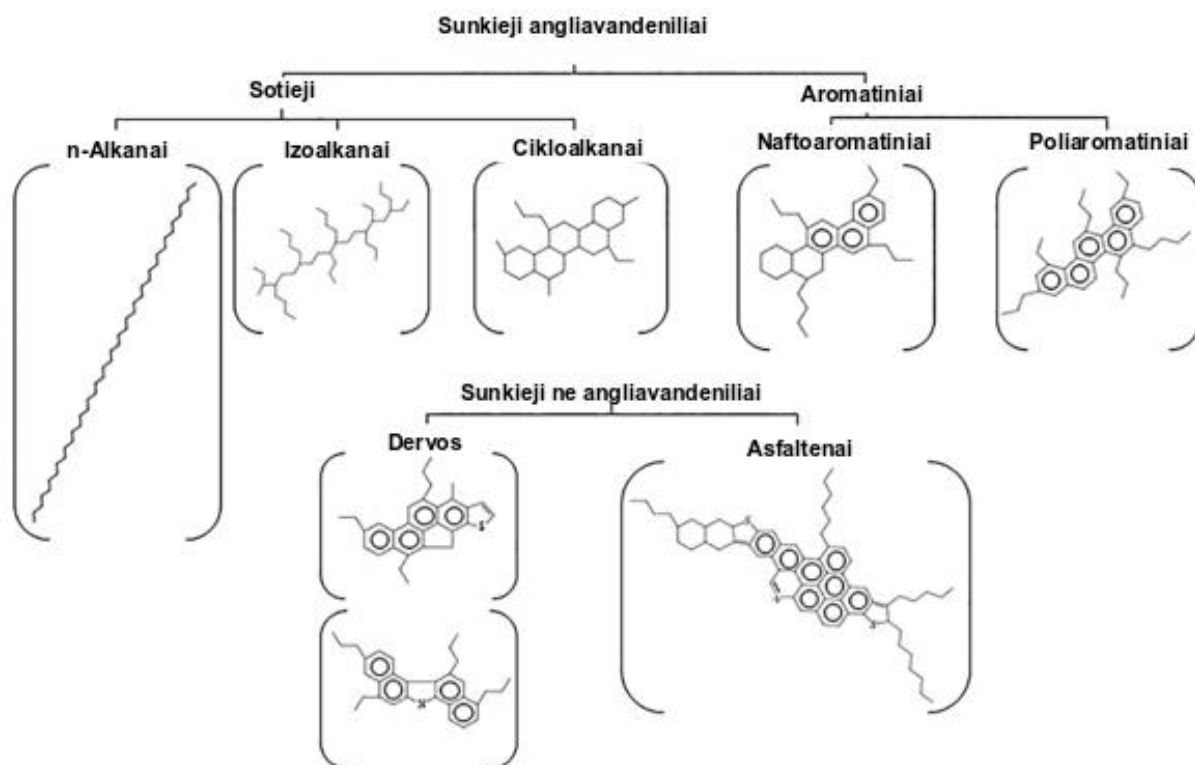


**1.7 pav.** Diciklopentadieno dervos grupės monomeras diciklopentadienas.

Diciklopentadieno dervoje yra 70–95 % diciklopentadieno žaliavos, sumaišytos su kitais dienais. Palyginti su alifatinėmis ir aromatinėmis dervomis, DCPD dervos yra labiau nesočiosios. 1.7 paveiksle pavaizduotas diciklopentadieno dervų grupės monomeras diciklopentadienas.

#### 1.2.4 Asfaltenai

Asfaltenai yra labai sudėtingos molekulinės struktūros naftos angliavandeniliai, savo sudėtyje turintys sieros (0,3–10,3 %), deguonies (0,3–4,8 %), azoto (0,6–3,3 %) ir metalo elementų, tokių kaip nikelis, geležis ir vanadiumas (Tavassoli *et al.*, 2012). Tai didelės molekulinės masės junginiai, tirpūs aromatinuose angliavandeniliuose, tokiuose kaip toluenas, benzenas ir ksilenas, tačiau netirpūs įprastuose tirpikliuose, tokiuose kaip pentanas, heptanas ir dekanas. Dėl termodinaminės pusiausvyros tarp žalios naftos komponentų asfaltenai natūraliai suspenduojami žaliavinėje naftoje, tačiau dėl bet kokio slėgio ar sudėties pokyčio, asfaltenai kaupiasi ir nusėda (Iraji ir Ayatollahi, 2019).



1.8 pav. Angliavandenilių klasifikacija pagal Brown *et al.*, 2017.

Brown su kolegomis savo darbe (Brown *et al.*, 2017) nurodo dar vieną klasifikaciją (1.8 pav.), kurioje sočiuosius angliavandenilius ir aromatinčius angliavandenilius priskiria angliavandeniliams, nes šie junginiai susideda tik iš anglies ir vandenilio atomų, o dervas ir

asfaltenuis priskiria ne angliavandeniliams, dėl jų sudėtyje esančių papildomų elementų, tokių kaip azotas, siera ir deguonis.

### 1.3 Angliavandenilių biodegradacija

Bakterijų biodegradacija yra pagrindinis natūralus mechanizmas, kuriuo pagalba naftos angliavandenilių teršalai gali būti išvalomi iš aplinkos (Jadhav *et al.*, 2019). Bakterijos gebančios degraduoti naftos angliavandenilius yra laikomos aktyviausiais skaidymo mikroorganizmais. Biodegradacijos proceso greitis priklauso nuo esamų bakterijų, skaidomų junginių bei aplinkos sąlygų (Uzair *et al.*, 2016).

Naftos angliavandenilių biodegradacijos procesas vyksta dėl mikroorganizmų išskiriamų fermentų, kurie katalizuoja degradacijos reakcijas (Li *et al.*, 2019). Šios bakterijos angliavandenilius naudoja kaip anglies ir energijos šaltinį. Biodegradacijos rezultatas yra CO<sub>2</sub> susidarymas (Uzair *et al.*, 2016).

Bakterijų naftos angliavandenilių skaidymo procesas turi keturias pagrindines dalis. Pirmiausia nafta ar jos produktai emulguojami paviršiaus aktyviosiomis medžiagomis – biosurfaktantais, kurias išskiria mikroorganizmai. Po to emulguoti naftos angliavandeniliai adsorbuojami mikroorganizmo paviršiuje. Adsorbuoti ląstelės membranos paviršiuje naftos angliavandeniliai patenka į ląstelės membraną aktyvaus ar pasyvaus transportavimo metu bei endocitozės būdu. Patekę į ląstelės vidų naftos angliavandeniliai reaguoja su atitinkamais fermentais. Fermentinės reakcijos metu vyksta angliavandenilių degradacija (Li *et al.*, 2019).

Naftos skilimo keliai skiriasi priklausomai nuo bakterijų gebėjimo degraduoti angliavandenilius aerobinėmis arba anaerobinėmis sąlygomis (Uzair *et al.*, 2016). Bakterijos, naudodamos skirtingas fermentų sistemas, gali degraduoti naftos angliavandenilius aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis. Aerobinėmis sąlygomis elektronų akceptorius yra deguonis, o anaerobinėmis sąlygomis vietoje deguonies naudojamas sulfatas ir nitritai (Ji *et al.*, 2013).

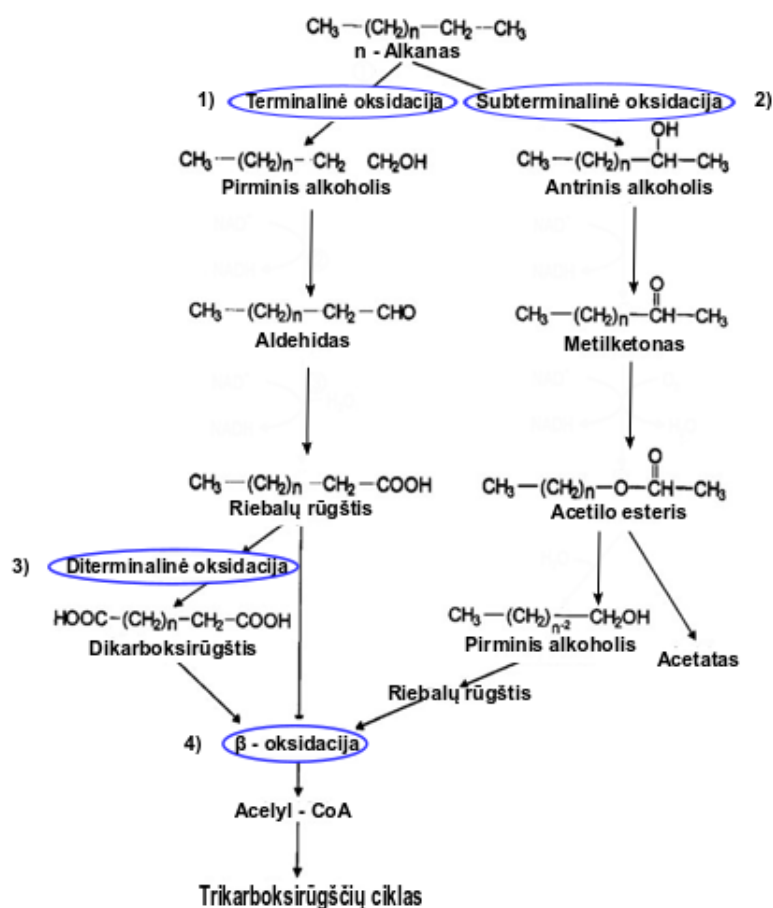
#### 1.3.1 Aerobinės degradacijos mechanizmas

Greičiausias bei visiškas angliavandenilių suskaidymas vyksta aerobinėmis sąlygomis. Bakterijos sočiuosius ir aromatinius angliavandenilius skaido skirtingais keliais. Sotieji angliavandeniliai oksiduojami keturiais skirtingais oksidacijų keliais (terminalinė, subterminalinė, diterminalinė ir β-oksidacija), aromatiniai angliavandeniliai – oksiduojami

skirtingais fermentais iki vieno iš trijų dihidroksilintų tarpinių metabolitų: katecholio, protokatechuito arba gentizato (Uzair *et al.*, 2016).

### 1.3.1.1 Sočiųjų angliavandenilių aerobinės degradacijos mechanizmas

Alkanų degradacijos mechanizmas susideda iš keturių oksidacijos tipų, kurie klasifikuojami į: terminalinę, subterminalinę, diterminalinę ir β-oksidaciją (Ji *et al.*, 2013). Terminalinėje oksidacijoje n-alkano katabolizmas prasideda jo oksidacija į atitinkamą pirminį alkoholį, kuris toliau oksiduojamas alkoholio dehidrogenazėmis į atitinkamą aldehydą, kuris oksiduojamas aldehido dehidrogenazėmis ir virsta riebalų rūgštimi (Ji *et al.*, 2013; Uzair *et al.*, 2016). Riebalų rūgštis toliau jungiasi su CoA ir β-oksidacijos būdu susidaro acetilo kofermentas A (acetyl-CoA), kuris patenka į trikarboksirūgščių ciklą (Wentzel *et al.*, 2007; Uzair *et al.*, 2016). Alkanų aerobinės degradacijos mechanizmo schema pateikta 1.9 paveiksle.



**1.9 pav.** Sutrumpinta alkanų aerobinės degradacijos mechanizmo schema. Paveiksle pažymėti keturi oksidacijos tipai: 1) terminalinė oksidacija; 2) subterminalinė oksidacija; 3) diterminalinė oksidacija; 4) β-oksidacija (pagal (Uzair *et al.*, 2016)).

Diterminalinės oksidacijos metu n-alkanai, kurie buvo oksiduoti iki atitinkamos riebiosios rūgšties terminalinės oksidacijos metu, galinėje metilo grupėje (ω padėtyje) patiria

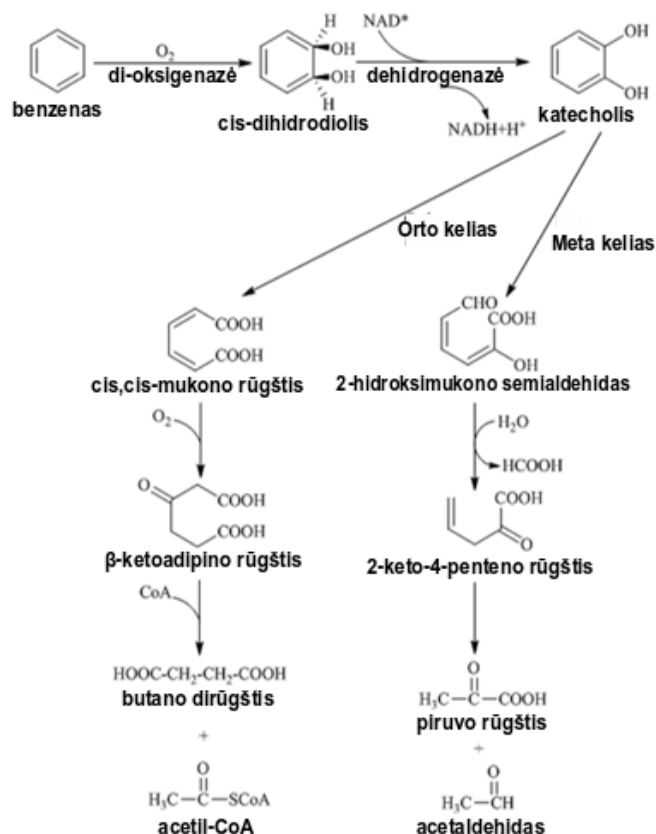
$\omega$ -hidroksilinimą ir susidaro  $\omega$ -hidroksi riebalų rūgštis, kuri toliau virsta dikarboksirūgštimi, ir patenka į  $\beta$ -oksidacijos procesą (Ji *et al.*, 2013).

Subterminalinėje oksidacijoje alkanai yra paverčiami antriniu alkoholiu, dėl kurio susidaro ketonas, Šis procesas vyksta, kai alkanai yra oksiduojami antrinio anglies atomo padėtyje – susidaro antrinis alkoholis (Ji *et al.*, 2013) Antrinis alkoholis paverčiamas atitinkamu ketonu, kuris oksiduojamas Baeyer-Villiger monoksigenaze, kad susidarytų esteris. Esteris hidroksilinamas esteraze, sukuriant alkoholį kuris galiausiai virsta riebalų rūgštimi ir patenka į  $\beta$ -oksidacijos procesą (Ji *et al.*, 2013; Uzair *et al.*, 2016).

Šias reakcijas katalizuoja skirtingi oksigenazės fermentai, tokie kaip: propano monoksigenazė, skirtingos klasės butano monooksigenazės, citochromo P450 monooksigenazės, flavinus naudojančios monooksigenazės, neheminės geležies monooksigenazės ir varį turinčios monooksigenazės (Uzair *et al.*, 2016).

### 1.3.1.2 Aromatinių angliavandenilių aerobinės degradacijos mechanizmas

Aromatiniai angliavandeniliai taip pat yra degraduojami aerobinėmis sąlygomis (Uzair *et al.*, 2016). Degradacijos procesas pradedamas aromatinių angliavandenilių oksidacija, veikiant molibdeninėmis dehidrogenazėmis ar monooksigenazėmis. 1.10 schemoje pavaizduotas aromatinių angliavandenilių skaidymo kelias.



**1.10 pav.** Benzeno aerobinės degradacijos mechanizmo schema (pagal Gupte *et al.* 2016).

Aromatinį žiedą veikiant hidroksilinančiomis dioksigenazėmis susidaro di ar trihidroksilinti junginiai. Dauguma aromatinių angliavandenilių, nepaisant jų skirtingos struktūros, yra degraduojami iki vieno iš trijų dihidroksilintų tarpinių metabolitų, tokių kaip: katecholis (1,2-dihidroksibenzenas), protokatechuatas (3,4-dihidroksibenzoatas) arba gentizatas (2,5-dihidroksibenzoatas). Šiuos junginius atpažįsta aromatinį žiedą atidaranti dioksigenazė, kurios katalizuoja oksidacinį dvigubo ryšio skėlimą dihidroksilintame aromatiname junginyje, tokiu būdu atidarant aromatinį žiedą. Priklausomai nuo jungties skilimo padėties, išskiriami du keliai: meta ir orto. Susidaro tokie metabolitai kaip acetyl-CoA, sukcinilo-CoA ir piruvatas, kurie galiausiai patenka į trikarboksirūgšties ciklą (Fuchs *et al.*, 2011; Kutanovas, 2013; Uzair *et al.*, 2016).

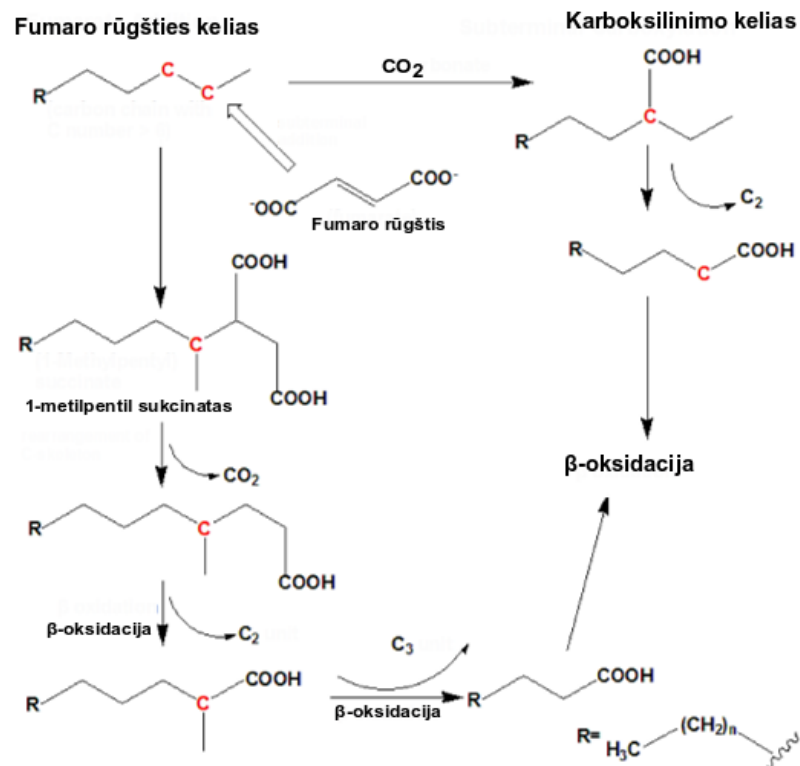
### 1.3.2 Anaerobinės degradacijos mechanizmas

Ši degradacijos mechanizmą naudoja anaerobinės bakterijos, tokiose sąlygose kur deguonies difuzija yra ribota, pavyzdžiui giliai dirvožemyje (Jadhav *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2013). Anaerobinės degradacijos mechanizmas skiriasi nuo aerobinio naftos angliavandenilių skaidymo kelio (Uzair *et al.*, 2016).

#### 1.3.2.1 Sočiųjų angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmas

Anaerobinėse sąlygose bakterijos kaip elektronų akceptorių vietoje deguonies naudoja sulfatą arba geležį (Ji *et al.*, 2013). Išskiriami du pagrindiniai n-alkanų anaerobinės degradacijos mechanizmai: fumaro pridėjimo kelias bei karboksilinimas (1.11 pav.) (Ji *et al.*, 2013; Mbadanga *et al.*, 2011).

Fumaro rūgšties mechanizme n-alkanai iš pradžių reaguoja su fumaro rūgštimi. Katalizuojant alkilsukcinato sintazės, gaunamas 2-alkilsukcinatas. Toliau 2-alkilsukcinatas skaidomas vykstant anglies skeleto pertvarkymo, dekarboksilinimo ir  $\beta$ -oksidacijos procesam. 2-alkilsukcinato susidarymas yra fumaro rūgšties įterpimo mechanizmo biocheminiu žymenimis. Šuo anaerobiniu keliu yra taip pat skaidomi kai kurie cikloalkanai, izoalkanai, aromatiniai angliavandeniliai ir policikliniai aromatiniai angliavandeniliai (Bian *et al.*, 2015; Boll *et al.*, 2020).



1.11 pav. Sočiųjų angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmai: fumaro kelias ir karboksilinimas (pagal So *et al.*, 2003).

Sočiųjų angliavandenilių karboksilinimo mechanizme alkanas yra karboksilinamas trečio anglies atomo (C-3) padėtyje. Gavus tarpinį produktą 1-metilpentil sukcinatą, pašalinami du anglies atomai, kad susidarytų riebalų rūgštis, kuri viena anglimi būtų trumpesnė nei pradinis alkanas. Ši riebalų rūgštis patenka į β-oksidacijos procesą, o vėliau į trikarboksirūgščių ciklą, kuriame suskaidoma iki CO<sub>2</sub> (Boll *et al.*, 2020; Callaghan, 2013; Grossi *et al.*, 2008; Mbadinga *et al.*, 2011).

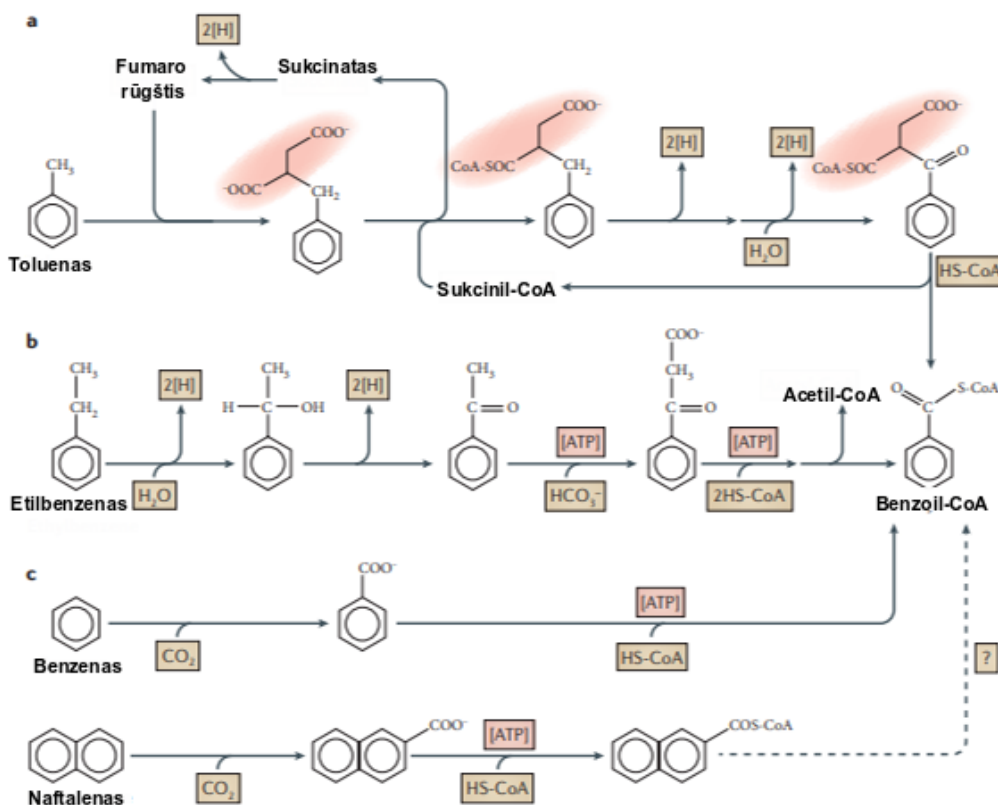
### 1.3.2.2 Aromatinių angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmas

Dėl anaerobinių sąlygų dirvožemyje ar požeminiame vandenyje, bakterijoms reikia visiškai kitokių aromatinių angliavandenilių skaidymo strategijų (Fuchs *et al.*, 2011). Trūkstant deguonies, neorganiniai junginiai, tokie kaip nitratas (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), manganas (Mn (IV)), geležis (Fe (III)), sulfatas (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) ir anglies dioksidas (CO<sub>2</sub>) veikia kaip elektronų akceptorai (Ladino-Orjuela *et al.*, 2016; Fuchs *et al.*, 2011). Nepaisant to, kad anaerobinėmis sąlygomis aromatinių angliavandenilių degradacija vyksta kitokiais mechanizmais nei aerobinėmis, kai kurie monocikliniai ir bicikliniai junginiai, tokie kaip BTEX, naftalenas ir 2-metilnaftalenas, yra lengvai skaidomi anaerobiniu būdu. Išskirti penki aromatinių angliavandenilių skaidymo būdai: 1) fosforilinimas; 2) fumaro rūgšties įterpimas; 3) nuo O<sub>2</sub> nepriklausomas hidroksilinimas; 4) karboksilinimas; 5) metilinimas (Ladino-Orjuela *et al.*, 2016) (1.12 pav.).



Fosforilinimo procese į aromatinį angliavandenilį yra įvedama fosfato grupė. Kai kuriuose mikroorganizmuose, pavyzdžiui denitrifikuojančiose bakterijose *Thauera aromatica*, fenolio metabolizmas prasideda nuo fenolio fosforilinimo iki fenilfosfato, katalizuojant fenilfosfato sintazės. Toliau fenilfosfatas defosforilinamas ir tuo pačiu metu karboksilinamas iki 4-hidroksibenzoato. Reakcija katalizuojamas fenilfosfato karboksilazės. 4-hidroksibenzoatas suaktyvinamas CoA ligaze ir paverčiamas 4-hidroksibenzoil-CoA, kuris yra redukciniu būdu dehidroksilinamas iki benzoil-CoA. (Fuchs, 2008; Fuchs *et al.*, 2011; Luo ir Larrosa, 2017; Narmandakh *et al.*, 2006).

Fumaro rūgšties įterpimo mechanizmas pasižymi tuo, jog prie alkilintų aromatinių angliavandenilių, tokių kaip toluenas, krezoliai ir ksilenai, yra pridedama fumaro rūgštis, kuri jungiasi prie metilo grupės, o etilbenzeno atveju - prie šoninės grandinės (Ladino-Orjuela *et al.*, 2016). Anaerobinio tolueno skaidymo metu, prisijungus fumaro rūgščiai, gaunamas benzilsukcinatas, kurį katalizuoja benzilsukcinato sintazė. Po to išsiskyręs benzilsukcinatas paverčiamas CoA tioesteriu nuo sukcinilo-CoA priklausomos CoA-transferazės pagalba. Benzilsukcinil-CoA β-oksidacijos keliu toliau skaidomas į tarpinius metabolitus benzoil-CoA ir sukcinil-CoA.



**1.12 pav.** Aromatinių angliavandenilių anaerobinės degradacijos mechanizmo schema (pagal Fuchs *et al.*, 2011). a) schemoje pavaizduota tolueno degradacija fumaro rūgšties keliu; b) schemoje – etilbenzeno degradacija nuo deguonies nepriklausomo hidroksilinimo keliu; c) schemoje – benzeno ir naftaleno karboksilinimo kelias.

Nuo deguonies nepriklausomo hidroksilinimo metu denitrifikuojančiose bakterijose yra skaidomas etilbenzenas arba propilbenzenas. Hidroksilinimo reakcijoje iš vandens prie

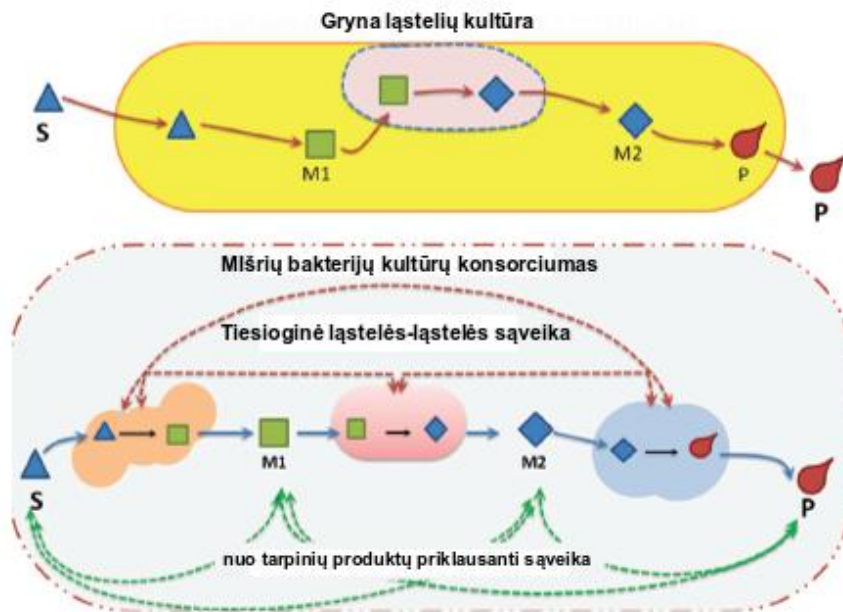
aromatinio angliavandenilio atitinkamos anglies atomo yra prijungiamas deguonis. Ši reakcija yra katalizuojama etilbenzeno dehidrogenazės, kuri etilbenzeną oksiduoja iki feniletanolio. Alkoholio dehidrogenazės feniletanolį oksiduoja iki acetofenono, kuris nuo ATP priklausoma karboksilaze skaidomas į benzoilacetatą. CoA ligazė benzoilacetatą paverčia į benzoilacetyl-CoA, kuris suskaidomas iki benzoil-CoA ir acetyl-CoA (Boll *et al.*, 2020; Fuchs *et al.*, 2011).

Metilinimo procesas aromatinių angliavandenilių skaidyme yra naudojamas naftaleno metabolizme (Ladino-Orjuela *et al.*, 2016). Naftalenas yra metilinimas į 2-metilnaftaleną, kuris vėliau oksiduojamas į centrinį metabolitą 2-naftoino rūgštį, žiedas redukuojamas ir skaidomas (Safinowski ir Meckenstock 2006).

#### 1.4 Mikroorganizmų konsorciumas

Mikroorganizmų konsorciumas apibūdinamas kaip skirtingų rūšių mikroorganizmų grupė, veikianti kartu kaip bendruomenė. Mikroorganizmų konsorciumai buvo naudojami dar žmogui nežinant apie mikroorganizmų egzistavimą. Žmonės manipuliavo mikroorganizmų konsorciumais, naudodami juos maisto produktų fermentacijoje, cheminių medžiagų ar derliaus pagerinimo tikslais. Šie, iki šiol naudojami procesai, per amžius liko optimizuoti. Pasitelkiant šiuolaikinės biochemijos ir mikrobiologijos metodais, konsorciumų kultūros išgrynintos bei dažnai genetiškai tobulinamos siekiant proceso efektyvumo ir aukščiausios produktų kokybės.

Struktūriškai prokariotinės ląstelės yra daug paprastesnės nei eukariotinės ląstelės. Prokariotai neturi su membranomis sujungtų organelių, todėl negali atskirti metaboliškai nesuderinamų biocheminių procesų į atskirus skyrius (1.13 pav). Prokariotai, metabolinių procesų „suskirstymą į dalis“ sprendžia formuojant konsorciumus su kitais mikroorganizmais, kurie apsaugo nuo galimų aplinkos slopinančių veiksnių, tokių kaip: netinkama deguonies koncentracija, ultravioletinė spinduliuotė, išsausėjimas bei netinkamas pH. Mikroorganizmų sudarytas konsorciumas palengvina abipusius maistinių medžiagų, dujų ir metabolitų mainus. Asociacijos atspindi sinergetinį ar sinchronišką gyvenimo būdą, kuriame augimas ir biocheminiai ciklai vyksta efektyviau nei atskirai (Sabra ir Zeng, 2014).



**1.13 pav.** Substrato (S) pavertimas produktu (P), grynoje ir mišrioje mikroorganizmų kultūroje. Grynoje ląstelių kultūroje metabolinės reakcijos atskyrimas reikalingas konvertuoti tam tikrus toksiškus metabolitus (M). Mišrioje kultūroje stabilus konsorciumo sudaryme svarbūs yra šie aspektai: tiesioginė ląstelės-ląstelės sąveika bei nuo tarpinių produktų priklausanti sąveika.

Mikroorganizmų konsorciumai naudojami ne tik maisto fermentacijos procesuose, bet ir biotechnologijoje – biodujų gamyboje, nuotekų valyme (Sabra ir Zeng, 2014), o taip pat naftos degradacijoje (Sathishkumar *et al.*, 2008; Santisi *et al.*, 2015; Selvam ir Thatheyus, 2018).

## 1.5 Biosurfaktantai

Angliavandeniliai, turintys didesnę anglies atomų skaičių, yra mažiau tirpūs vandenyje ir todėl yra sunkiau prieinami bakterijų skaidymui. Todėl daugelis bakterijų gamina paviršiaus aktyvias medžiagas – biosurfaktantus. Paviršiaus aktyviosios medžiagos turi hidrofilines ir hidrofobines sritis, kurios sukelia skysčių, turinčių skirtingą poliškumą (kaip angliavandeniliai ir vanduo), adsorbciją fazių ribos paviršiuje ir stambių agregatų (micelių) susidarymą (Vijayakuma ir Saravanan, 2015). Šios paviršiaus aktyvios medžiagos tarnauja kaip bioemulsikliai, nes iš jų gaminamos micelės paskleidžia angliavandenilius ir tokiu būdu sudaro gerą angliavandenilių biologinį prieinamumą (Uzair *et al.*, 2016). Jie geba mažinti skysčių ir kietųjų medžiagų paviršiaus įtempį, paskleidžiant jas kaip emulsijas skysčiuose (Parthipan *et al.*, 2017).

Palyginus natūralios kilmės biosurfaktantus su cheminėmis paviršiaus aktyviosiomis medžiagomis, biosurfaktantai turi potencialių pranašumų: jie yra ekologiški, lengvai skaidomi, pigūs bei ekologiškas pagaminimo būdas, išlieka aktyvūs tokiomis sąlygomis kaip didelis druskingumas ir aukšta temperatūra. Biosurfaktantai yra plačiai naudojami įvairiems tikslams:

maisto perdirbimo pramonėje, aliejų utilizavimo procese ir naftos užterštų vietų biologiniame valyme (Parthipan *et al.*, 2017).

Atliekama daug tyrimų, siekiant pašalinti angliavandenilius iš nafta užterštos aplinkos, naudojant bakterijas gaminančias biosurfaktantus (Parthipan *et al.*, 2017; Sharma ir Pandey, 2020; Tripathi *et al.*, 2019). Biosurfaktantai pagerina angliavandenilių biodegradacijos procesą. Todėl paviršiaus aktyviosios medžiagos atlieka svarbų vaidmenį angliavandeniliais užterštos aplinkos bioremediacijoje, tačiau biosurfaktantų gamyba vis dar kelia sunkumų dėl žemo gamybos bei aktyvumo lygio ir ilgo gamybos proceso. Biosurfaktantų gamyba gali būti pagerinta naudojant didesnio aktyvumo bakterijų kamienus, terpės ir augimo sąlygų optimizavimas su pakaitiniais substratais bei metodų efektyvumo gerinimas, gali atverti kelią didelio masto nebrangiai biosurfaktantų gamybai (Parthipan *et al.*, 2017).

### 1.5.1 Biosurfaktantų klasifikacija

Biosurfaktantai yra suskirstyti į grupes, atsižvelgiant į jų cheminę sudėtį. Išskiriamos pagrindinės biosurfaktantų grupės: glikolipidai, lipopeptidai, riebalų rūgštys, fosfolipidai, neutralūs lipidai, polimeriniai biosurfaktantai ir biosurfaktantų dalelės (Santos *et al.*, 2016).

**Glikolipidai.** Glikolipidai yra mažos molekulinės masės biosurfaktantų klasė, kurią sudaro hidrofilinis angliavandenis, prijungtas prie hidrofobinės alifatinės arba hidroksilinės riebalų rūgšties. Nustatyta daugybė struktūriškai skirtingų glikolipidų struktūrų, kurias gamina įvairios bakterijų rūšys. Mikroorganizmas gali gaminti to paties glikolipido homologus, dėl riebalų rūgšties ilgio ir struktūros pasikeitimų bei angliavandeniu, kuriuos sudaro mono, di, tri arba tetrasacharidai (Clements *et al.*, 2019). Geriausiai žinomi glikolipidai yra ramnolipidai, soforolipidai ir trehalolipidai (Roy, 2018).

**Lipopeptidai.** Lipopeptidai tai mažos molekulinės masės junginių klasė, susidedanti iš hidrofilinio peptido prijungto prie hidrofobinio lipido ar riebalų rūgšties. Nustatyta plati lipopeptidų struktūrų įvairovė. Dėl lipidų fragmentų ilgio ir struktūros pasikeitimų, susidaro skirtingi lipopeptidų homologai. Tuo tarpu lipopeptidų analogai susidaro dėl skirtingos aminorūgščių sudėties peptido fragmente (Clements *et al.*, 2019). Bakterijos gamina didelį kiekį ciklinių lipopeptidų, įskaitant dekapeptidinius antibiotikus (gramicidinas) ir lipopeptidinius antibiotikus (polimiksinas) (Shah *et al.*, 2016).

**Riebalų rūgštys, fosfolipidai ir neutralūs lipidai.** Bakterijos gamina didelius kiekius riebalų rūgščių ir fosfolipidų tipo biosurfaktantų skaidant n-alkanus. Degraduojant angliavandenilius oksidacijos metu susidaro riebalų rūgštys iš alkanų dėl oksidacijos. Be šių

tiesiosios grandinės riebalų rūgščių, mikroorganizmai gamina riebalų rūgščių kompleksus, turinčius OH grupių, ir alkilo šakų. Fosfolipidai yra pagrindinė bakterijų membranos sudedamoji dalis. Kai tam tikrus angliavandenilius skaidančių bakterijų substrate yra alkanų, fosfolipidų kiekis padidėja (Shah *et al.*, 2016).

**Polimeriniai biosurfaktantai.** Dauguma šios grupės paviršiaus aktyviųjų medžiagų yra polimeriniai heterosacharidai, turintys savo sudėtyje baltymų. Geriausiai ištirti polimerai yra emulsanai, lipozanai, mannoproteinai ir polisacharidų baltymų kompleksai (Shah *et al.*, 2016).

**Granuliuoti biosurfaktantai.** Biosurfaktantų dalelės padalija bakterijų išorinės membranos pūsleles, sudarydamos mikroemulsiją (Shah *et al.*, 2016). Mikroemulsija pagal IUPAC yra apibūdinama kaip dispersija, kuri sudaryta iš vandens, aliejaus ir surfaktanto (Greičiūnaitė, 2018). Suformuotos mikroemulsijos vaidina esminį vaidmenį alkanų skaidyme. *Acinetobacter* spp. turi pūsleles, kurių skersmuo nuo 20 iki 50 nm, sudarytas iš baltymų, fosfolipidų ir lipopolisacharidų (Santos *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2016).

## 2 MEDŽIAGOS IR METODAI

Skyriuje „Medžiagos ir metodai“ yra pateiktos visos šiame darbe naudotos biologinės medžiagos ir metodai. Naudojami klasikinės mikrobiologijos, molekulinės mikrobiologijos, dujų chromatografijos bei biosurfaktantų nustatymo metodai.

### 2.1 Darbe naudotos medžiagos, terpės ir prietaisai

#### 2.1.1 Darbe naudotos medžiagos

**AppliChem, Vokietija:** glicerolis; Tris.

**Becton Dickinson International, Belgija:** mielių ekstraktas.

**Carl Roth, Vokietija:** agarozė, CaCl<sub>2</sub>, etanolis, gliukozė, n-heksanas.

**AB Mažeikių nafta:** valyta nafta.

**Merck, Vokietija:** agaras, KCl, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NSO<sub>4</sub>, Triton X-100.

**Sigma Aldrich, Vokietija:** EDTA, etidžio bromidas, FeCl<sub>3</sub>, florizilas (aktyvuotas magnio silikatas), mėsos ekstraktas, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

**Thermo Fisher Scientific:** DNR ilgio standartų mišinys (GeneRuler DNA Ladder Mix, 100-10000 bp); DNR ilgio ir koncentracijos standartų mišinys (MassRuler DNA Ladder Mix; Užnešimo dažas (MassRuler DNA Loading Dye (6x); **Rinkiniai** – GeneJET PCR Purification Kit; JetFlex Genomic DNA Purification Kit.

#### 2.1.2 Bakterijų auginimo terpės

Terpių sudėtis pateikta 1000 mL distiliuoto vandens. Pateiktos terpės autoklavuojamos 15 min. 121 °C temperatūroje.

##### **TSB (triptono sojos sultinys):**

- 17 g kazeino;
- 3 g sojų pupelių ekstrakto;
- 2,5 g gliukozės;
- 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 5 g NaCl.

##### **TSA (triptono sojos agaras):**

- 15 g triptono;
- 5 g sojos peptono;
- 5 g NaCl;
- 15 g agaro.

**Bushnell Haas terpė:**

- 0,2 g MgSO<sub>4</sub>;
- 0,02 g KCl;
- 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;
- 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>;
- 0,05 g FeCl<sub>3</sub>;
- 9 g NaCl.

### 2.1.3 Mikroorganizmai

Darbe buvo tirti laukiniai bakterijų kamienai: 30–1, P30–5, P30–9.1, P30–9.2, išskirti iš nafta užteršto dirvožemio mėginio.

#### 2.1.2. Darbe naudoti prietaisai

Autoklavas AMA260NT (Astell)

Elektroforezės rezultatų fiksavimo sistema – MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System)

Elektros srovės šaltinis – E865 (Consort)

Laminarinis boksas – MARS 1200, II saugumo klasė (ScanLAF)

pH matuoklis – OP-211/1 (Radelkis)

Stalinė centrifūga (Eppendorf)

Terminė purtyklė (Biosan)

Termocikleris – T100 (Bio-Rad)

Termostatas (Binder)

UV/Vis spektrofotometras – Ultrospec 5300 pro (Amersham Biosciences)

## 2.2 Darbe naudoti metodai

### 2.2.1 Mitybinių terpių ruošimas

Į kolbas, su reikiamu tūriu distiliuoto vandens, įdedamas tikslus, svarstyklėmis pasvertas kiekis sausų terpės miltelių arba atskiri terpės komponentai. Terpės iki reikiamo pH privedamos su 5 M HCl ar 5 M NaOH tirpalais. Su folija uždengtos kolbos autoklavuojamos 15 min prie 121 °C temperatūros. Po sterilinimo, standžios terpės atvėsinašamos iki 48 – 50 °C temperatūros ir laminarinėje spintoje aseptinėmis sąlygomis išpilstomos į Petri lėkštes po 25 – 30 mL. Naudojamos tik sustingusios ir 15 – 20 min aseptinėmis sąlygomis džiovintos tepės. Skystos terpės po sterilinimo atvėsinašamos iki kambario temperatūros, tuomet įdedamos papildomos reikalingos medžiagos.

## 2.2.2 Mikroorganizmų išskyrimas

Mikroorganizmai iš nafta užteršto dirvožemio mėginio išskiriami serijinių praskiedimų metodu. Į kolbas su 100 mL Bushnell Haas terpės, įnešamas 1 g dirvožemio mėginio. Mėginiai inkubuojami 24 val. purtyklėse prie 30 °C ir 55 °C temperatūros ir 160 apsukų per minutę. Po inkubacijos atliekami mėginių suspensijos skiedimai mėgintuvėliuose, iki 1:10<sup>5</sup> santykio. Iš kiekvieno mėgintuvėlio, su skirtingu praskiedimu, paimama po 100 µL tirpalo ir lašinama į Petri lėkšteles su sterilia TSA terpe. Suspensija išglaištoma terpės paviršiuje. Lėkštelės inkubuojamos 1 parą prie 30 °C ir 55 °C temperatūros. Užaugusios vizualiai skirtingos bakterijų kolonijos persėjamos ir išgryninamos. Vizualiai skirtingi išgryninti bakterijų izoliatai pagausinami skystoje TSB terpėje, inkubuojant 12 val. prie atitinkamos temperatūros, kurioje mikroorganizmai buvo auginami pirmąjį kartą, prie 30 °C arba 55 °C temperatūros. Pagausinti mikroorganizmai perkeliama į mėgintuvėlius, sumaišomi su 60 % koncentracijos steriliu gliceroliu (800 µL kultūros suspensijos ir 200 µL glicerolio) ir saugomi prie -70 °C temperatūros.

## 2.2.3 Išskirtų izoliatų atranka

Vizualiai skirtingi išgryninti bakterijų izoliatai tikrinami auginant druskų terpėje (Bushnell Haas), papildomai pridedant 1 % naftos. Tyrimams buvo naudojama valyta nafta. Užtikrinant sterilumą, nafta buvo filtruojama per 0,2 µm filtrus. Į kolbą su druskų terpe įnešamas 1 % valytos naftos ir 1 % izoliato suspensijos, prieš tai pagausinus TSB terpėje 12 val. prie atitinkamos temperatūros (30 °C arba 55 °C) ir išvalius nuo terpės, centrifuguojant 1 mL inokuliatu 1 min prie 3,000 aps./min., nupilant terpę bei užpilant fiziologiniu tirpalu. Procesas kartojamas kelis kartus. Po pilno terpės išvalymo, 1 % izoliato perkeliama į druskų terpę su nafta. Toliau kolbos inkubuojamos 3 paras prie 30 °C arba 55 °C temperatūros. Periodiškai atliekami serijiniai išsėjimai, siekiant nustatyti izoliatų augimą, skaičiuojant ir lyginant kolonijų skaičių. Išsėjimai atliekami 30 min. po izoliatų įnešimo į terpę ir po kiekvienos inkubacijos paros.

## 2.2.4 Suminės DNR skyrimas

Suminės DNR skyrimui buvo naudojamas JetFlex Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinys ir protokolai. Mikrobiologine kilpele nuo Petri lėkštelės mikroorganizmai užsėjami į 5 mL TSB terpės ir inkubuojami atitinkamoje temperatūroje iki eksponentinės augimo fazės pabaigos maišant 160 aps./min. greičiu. Po



augimo, 500  $\mu\text{L}$  bakterijų kultūrų įnešama į 1,5 mL centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 1 minutę 12,000 aps./min. greičiu. Supernatantas išpilamas. Ląstelės sumaišomos su 300  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA ir 2 mg/mL lizocimu. Tirpalas gerai išmaišomas ir inkubuojamas 30 minučių 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos mėgintuvėliai centrifuguojami 1 minutę 12,000 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas. Įpilama 300  $\mu\text{L}$  ląstelių lizės buferio (CLB) ir automatinė pipete sumaišoma, kad ląstelės lizuotųsi. Įpilama 10  $\mu\text{L}$  proteinazės K ir inkubuojama 58 °C temperatūroje 1 valandą. Po inkubacijos įpilama 10  $\mu\text{L}$  RNazės A ir inkubuojama 5 minutes 37 °C temperatūroje. Lizatas atvėsina iki kambario temperatūros ir 300  $\mu\text{L}$  perkaliama į sterilius mėgintuvėlius. Į 300  $\mu\text{L}$  lizato įpilama 150  $\mu\text{L}$  baltymų precipitacijos buferinio tirpalo (PPT). Suspensija homogenizuojama maišant 20 sekundžių ir centrifuguojama 3 minutes 12,000 aps./min. greičiu. Supernatantas perpilamas į sterilų mėgintuvėlį ir įpilamas vienodas tūris izopropanolio. Mišinys homogenizuojamas kelis kartus apverčiant mėgintuvėlį. Centrifuguojama 3 minutes 12,000 aps./min. greičiu. Atsargiai nupilamas supernatantas ir mėgintuvėlis keletą minučių apverčiamas virš sugeriamojo popierinio rankšluosčio, kad likęs skystis nutekėtų. Į mėgintuvėlį įpilamas 1 mL 70% etanolio. Mėgintuvėlis kelis kartus apverčiamas, kad nuplauti DNR granules ir centrifuguojamas 1 minutę 12,000 aps./min. greičiu. Atsargiai nupilamas supernatantas ir mėgintuvėlis vėl laikomas keletą minučių virš sugeriamojo popierinio rankšluosčio, kad likęs skystis nutekėtų. Inkubuojama 10 minučių 50 – 55 °C temperatūroje, kad likęs etanolis išgaruotų. DNR tirpinama 200  $\mu\text{L}$  TE buferiniame tirpale ir saugoma -20 °C temperatūroje. Išskirtos DNR kiekis nustatoma DNR elektroforezės agarozės gelyje metodu (2.2.5).

### 2.2.5 DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR fragmentų nustatymui elektroforezės būdu naudojamas agarozės gelis. Į 1× TAE buferinį tirpalą (40 mM Tris-acetatas, 0,1 mM EDTA, pH 8,3) įdedama agarozės iki 0,8 % koncentracijos. Tirpalas užvirimas iki pilno agarozės ištirpimo, vėsina iki 40 – 50 °C temperatūros. Į atvėsusį tirpalą įdedama etidžio bromido iki 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijos, gerai išmaišoma ir supilama į elektroforezės gelio formavimo talpą. Laukiama 20 – 30 min iki pilno gelio sustingimo. Sustingęs gelis įdedamas į elektroforezės vonelę bei užpilamas 1× TAE buferiniu tirpalu. Išimama plastikinė forma ir į susiformavusius šulinėlius supilami analizuojami mėginiai sumaišyti su užnešimo dažu (MassRuler DNA Loading Dye (6x), Thermo Fisher Scientific). Į vieną šulinėlį pilamas DNR ilgio standartų mišinys (GeneRuler DNA Ladder Mix, 100 – 10000 bp, Thermo Fisher Scientific). Elektroforezė vykdoma esant

10 V cm<sup>-1</sup> įtampai. Stabdoma, kai mėginiai su dažu nueina 2/3 gelio ilgio. Gelis vizualizuojamas apšvietus UV šviesa (MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System)).

#### 2.2.6 Polimerazės grandininė reakcija

DNR fragmento pagausinimui naudojama polimerazės grandininė reakcija, kuriai naudojamas mišinys iš šių komponentų: 10× *Taq* buferinis tirpalas 12,5 μL, 2 mM dNTP mišinys po 0,2 mM kiekvieno dNTP, pradmenys po 0,5 μM, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 ng matricinės DNR, *Taq* polimerazės 2,5 U/100 μL ir vandens iki 100 μL. Paruošti mišiniai talpinami į termociklerį (Bio Rad), kuriame reakcija paleidžiama pagal tokią programą:

1. Pirminė denatūracija: 95 °C 2 min.;
2. Denatūracija: 95 °C 1 min.;
3. Pradmenų prilydymas: T °C (priklausomai nuo pradmenų lydymosi temperatūros) 1 min.;
4. Sintezė: 72 °C t min. (priklausomai nuo PGR produkto ilgio);
5. Galutinis ilginimas: 72 °C 7 min.

Grandinių atskyrimas, pradmenų prilydymas ir grandinės ilginimo stadijos kartojamos 30 ciklų. Po reakcijos mėginiai laikomi 4 °C temperatūroje. DNR fragmentai, gauti polimerazės grandininės reakcijos metu, analizuojami DNR elektroforezės agarozės gelyje metodu (2.2.5).

#### 2.2.7 PGR produktų analizė

Gauti DNR fragmentai (2.2.5) po elektroforezės (2.2.4) valomi, naudojant PGR reakcijos mišinius ir GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį. Išvalius DNR fragmentus, atliekamas koncentracijos nustatymas, naudojant MassRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific), kurio pagalba vertinant elektroforezės agarozės gelyje rezultatus, vizualiai nustatoma PGR produkto koncentraciją. Atliekama DNR fragmentų sekoskaita VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre. Gauti sekoskaitos rezultatai naudojami filogenetiniam giminingumui nustatyti (16S rDNR) bei filogenetinei priklausomybei nustatyti, sudarant filogenetinius medžius. 16S ribosominės DNR (rDNR) ir genų sekų analizė atliekama naudojant BLAST algoritmą (NCBI).

#### 2.2.8 Dujų chromatografijos metodas

Darbe buvo naudojamas dujų chromatografijos metodas (GC-FID) bei pritaikoma modifikuota metodika, siekiant nustatyti angliavandenilių biodegradacijos procesą.

#### 2.2.8.1 Mėginių kultivavimas ir paruošimas dujų chromatografijos metodui

Mikrobiologine kilpele nuo Petri lėkštelės mikroorganizmai užsėjami į 5 mL TSB terpės ir inkubuojami atitinkamoje temperatūroje iki eksponentinės augimo fazės pabaigos maišant 160 aps./min. greičiu. Po augimo, 1 mL bakterijų kultūrų centrifuguojama 1 minutę 3,000 aps./min. greičiu. Po centrifugavimo supernatantas atsargiai nupilama ir vietoj jos užpilamas 1 mL sterilaus fiziologinio tirpalo. Procesas kartojamas kelis kartus. Po pilno terpės išvalymo 1 % izoliato suspensijos perkeliama į druskų terpę. Mikroorganizmų kultivavimui naudojama Bushnell Haas druskų terpė ir 1 % valytos naftos. Užtikrinant sterilumą, nafta filtruojama per 0,2 μm filtrus. Lygiagrečiai su mėginiais inkubuojama kontrolė – terpė su 1 % valytos naftos. Kolbos inkubuojamos 7 paras prie atitinkamos temperatūros. Užtikrinant, kad terpė bei nafta inkubacijos laikotarpiu negaruotų, eksperimentuose buvo naudojami sandarūs stikliniai buteliukai su užsukamais kamšteliais.

Po inkubacijos atliekama mėginių ekstrakcija. Mėginys užpilamas 10 mL n-heksanu, gerai išmaišomas ir perkeliamas į dalinamąjį piltuvą. Kolba plaunama su 10 mL n-heksanu ir taip pat perkeliama į dalinamąjį piltuvą. Heksanas yra mažesnio tankio už vandenį tirpiklis, todėl sudaro viršutinį sluoksnį. Po ekstrakcijos, vanduo (apatinis sluoksnis) yra pašalinamas, o organinė fazė plaunama pridodant 10 mL vandens. Organinis sluoksnis atskiriamas, perkeliamas į 25 mL matavimo kolbą ir skiedžiamas iki fiksuoto tūrio. Dalis tirpalo perkeliama į florizilo kalonėlę, kuri sudaryta iš pastero pipetės, užkimštos stiklo vata ir pripildytos florizilu (aktyvuotas magnio silikatas), tam kad atskirti naftos angliavandenilius nuo įvairių polinių junginių, susidariusiu mikroorganizmų metabolizmo metu. Išvalytas ekstraktas surenkamas į 1,5 mL chromatografinį indelį.

#### 2.2.8.2 Angliavandenilių kiekio nustatymas dujų chromatografijos metodu

Chromatografinis indelis įdedamas į chromatografą ir eliuato alikvotinė dalis analizuojama kapiliarine dujų chromatografija su nepoline kolonėle ir liepsnos jonizacijos detektoriumi (LJD). Analizuojant mėginių chromatogramas yra lyginami mėginių smailių protai tarp n-dekano ir n-tetrakontano su kontrolės, kuri inkubavosi be mikroorganizmų, smailių plotais. Skaičiuojamas angliavandenilių pokytis mėginiuose, kuris išreiškiamas procentais.

#### 2.2.9 Degradacijos proceso optimizavimas

Mikroorganizmų degradacijos procesas optimizuojamas naudojant pridėtines medžiagas. Į Bushnell Haad terpę papildomai buvo įdėtas 0,01 % kompleksinio druskų mišinio, sudaryto iš tokių komponentų kaip:  $MgCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NSO_4$ ,  $MnSO_4$ . Degradacijos proceso optimizacijai, Bushnell Haad druskų terpė buvo papildoma 0,01 % mielių ir mėsos ekstraktu, taip pat atliekami auginimai naudojant papildomai 0,01 % gliukozės. Siekiant sumažinti naftos paviršiaus įtempį buvo naudojamas 50 mg/L koncentracijos Triton X-100 surfaktantas.

#### 2.2.10 Biosurfaktantų aktyvumo nustatymas

Siekiant iširti, ar tiriami mikroorganizmai išskiria biosurfaktantus, darbe buvo panaudoti biosurfaktantų aktyvumo nustatymo metodai, tokie kaip: emulsifikacijos aktyvumo nustatymo bei naftos išstūmimo metodas.

Prieš atliekant biosurfaktantų tyrimus, buvo sudaromos augimo kreivės, matuojant kas valandą auginamų kultūrų optinį tankį ( $OT_{600}$ ), siekiant nustatyti kiekvieno iš mikroorganizmų eksponentinę fazę bei perėjimą į stacionarią augimo fazę. Tai nustačius, mikroorganizmų kultūros buvo auginamos iki eksponentinio laikotarpio. Šioje mikroorganizmų augimo fazėje buvo atliekami visi biosurfaktantų tyrimai.

Atliekant emulsifikacijos aktyvumo nustatymo tyrimą buvo naudojamas filtruotas per 0,2  $\mu m$  filtrus kultūrų supernatantas bei žibalas. Į mėgintuvėlius talpinama po 3 mL supernatanto ir žibalo. Tirpalas maišomas 2 min. Mėginiai analizuojami vizualiai, vertinant po 24 val. Skaičiuojamas emulsifikacijos indeksas ( $E_{24}$ ), kurio formulė yra:

$$E_{24} = \frac{\text{Emulsijos aukštis}}{\text{Bendras vandeninės fazės ir emulsijos aukštis}} \times 100\%$$

Atliekant naftos išstūmimo tyrimą, buvo naudojama per 0,2  $\mu m$  filtrus filtruota nafta ir kultūrų supernatantas, kuris surenkamas eksponentinėje mikroorganizmų augimo fazėje.

Petri lėkštutės pripildomos 50 mL distiliuoto vandens, lėtai pilama 100  $\mu L$  naftos. Naftai nusistovėjus, ant jo paviršiaus lašinama 10  $\mu L$  supernatanto. Vizualiai vertinamas naftos išstūmimas bei skaičiuojamas susiformavusio apskritimo (naftos išstūmimo) paviršiaus plotas.

### 3 REZULTATAI

#### 3.1 Mikroorganizmų gebančių degraduoti naftą paieška

Iš nafta užteršto dirvožemio mėginio, gauto iš Kazachstano Aktau miesto Maersk Oil Kazakhstan naftos gavybos įmonės, buvo išskirti 27 vizualiai skirtingi izoliatai, kurie išgryninti bei užšaldyti. Atlikta visų 27 izoliatų patikra, auginant druskų terpėje su nafta. Iš atliktų serijinių išsėjimų, atrinkti 4 izoliatai (30–1; P30–5; P30–9.1; P30–9.1) pasižymintys aktyviausiu augimu viso inkubacijos periodo laikotarpiu. Izoliatų augimo rezultatai pateikti 3.1 lentelėje.

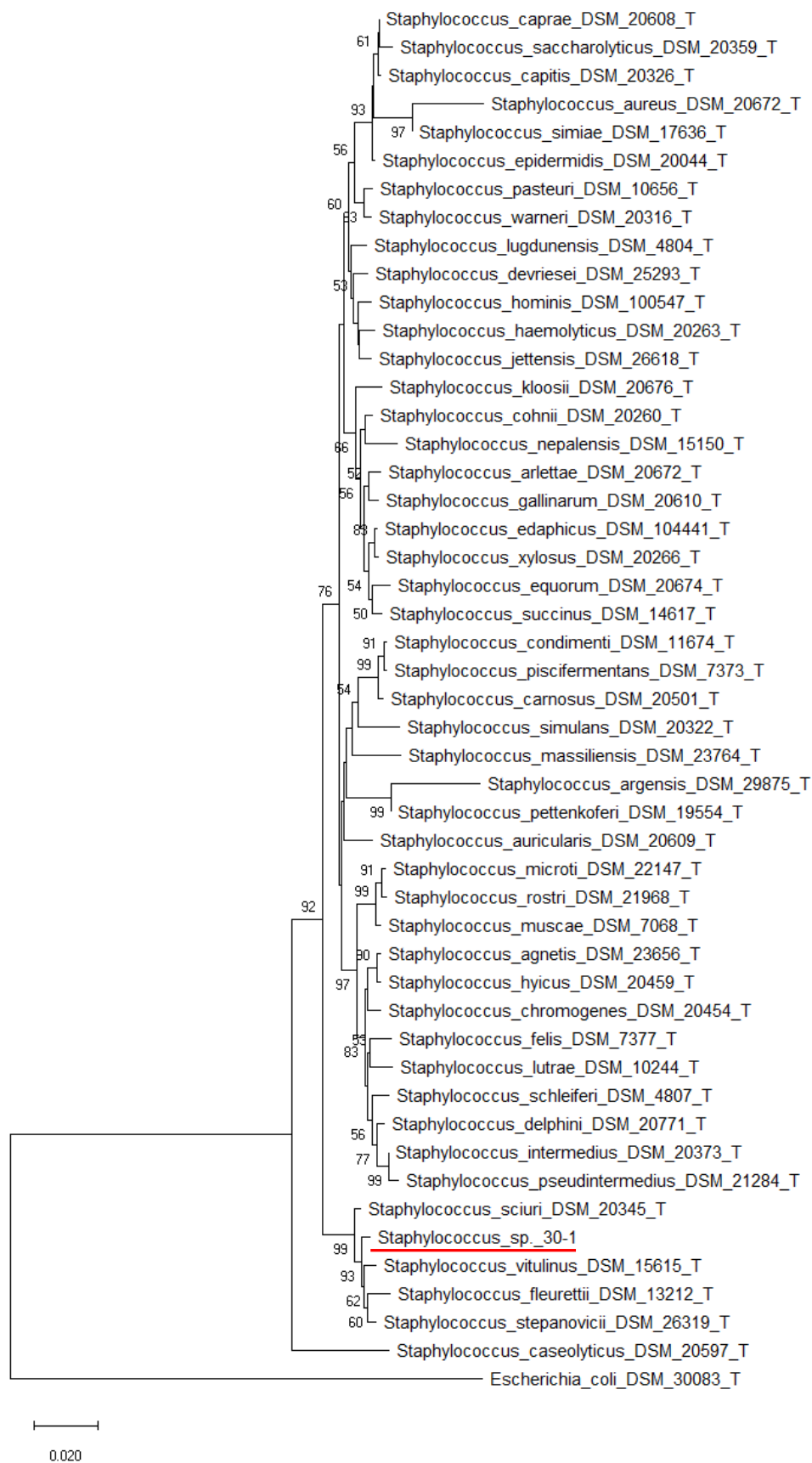
3.1 lentelė. Izoliatų augimo rezultatai.

	Izoliatai			
	30–1	P30–5	P30–9.1	P30–9.2
Kolonijų skaičius po 30 min. inkubacijos	$3,9 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$3,8 \times 10^4$
Kolonijų skaičius po 3 parų inkubacijos	$4,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$

##### 3.1.1 Atrinktų izoliatų identifikavimas

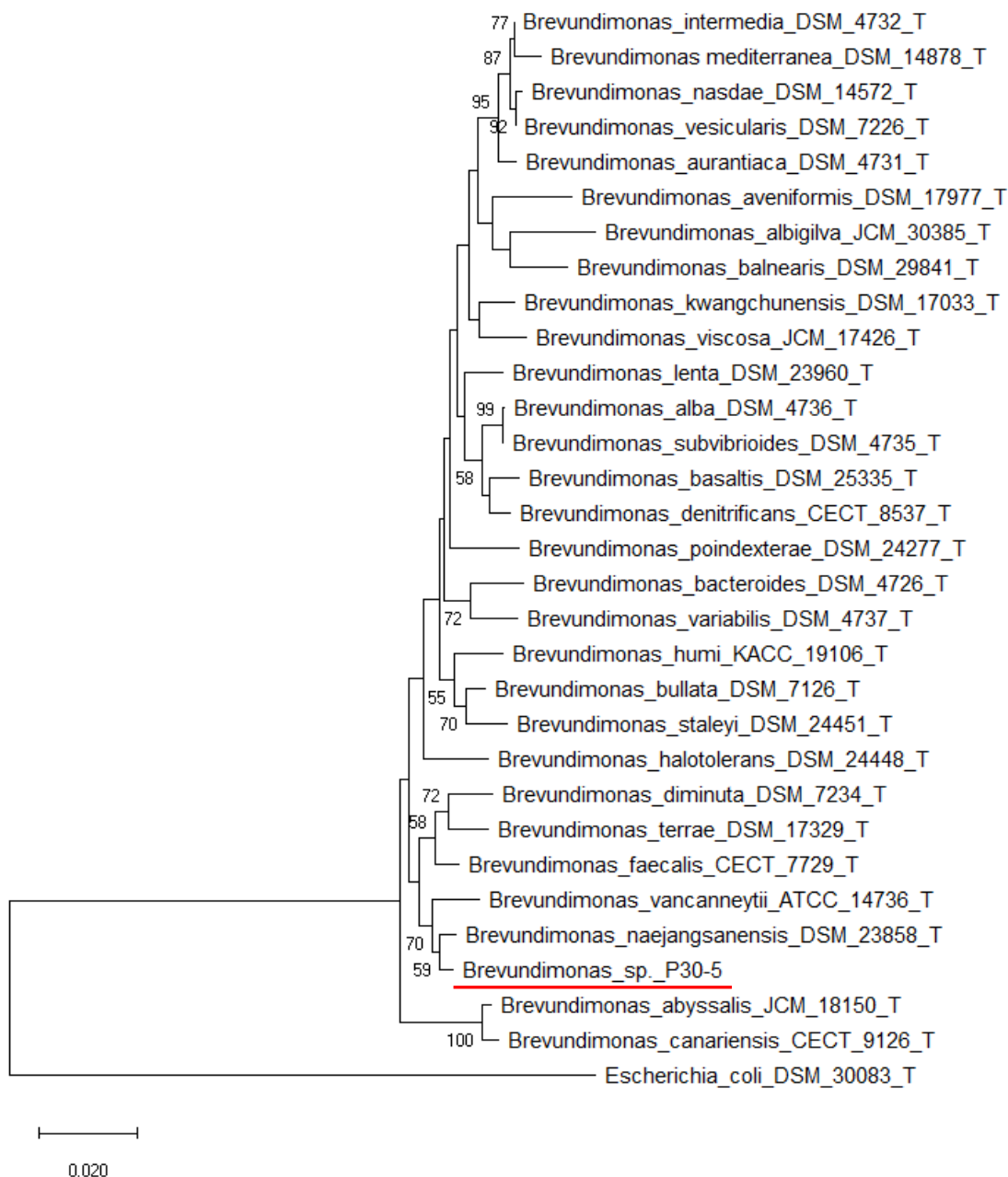
Siekiant identifikuoti atrinktus 4 izoliatų (30–1; P30–5; P30–9.1; P30–9.2) ir priskirti juos genčiai, izoliatai buvo užauginti bei išskirtos jų suminės DNR. Polimerazės grandininės reakcijos metu, naudojant universalius 16S rDNR pradmenis 27F ir 1495R, buvo pagausinti izoliatų 16S rDNR genai. Po PGR produkto išvalymo ir koncentracijos nustatymo mėginiai siunčiami sekoskaitai. Gauti sekoskaitos rezultatai analizuojami naudojant BLASTn algoritmą (NCBI).

Atlikus kamieno 30–1 sekoskaitos analizę, naudojant BLASTn algoritmą (NCBI), nustatytas giminingumas *Staphylococcus lentus* rūšiai (99,35 % panašumas) (Schleifer et al., 1983). Siekiant nustatyti *Staphylococcus* sp. 30-1 kamieno filogenetinę padėtį tarp kitų *Staphylococcus* genties tipinių kamienų, nubraižytas filogenetinis medis, (3.1 pav.) (Saitou and Nei, 1987). Filogenetinio medžio analizė patvirtina *Staphylococcus* sp. 30–1 kamieno priklausomybę *Staphylococcus* genčiai ir turi didžiausią panašumą tipinei *Staphylococcus sciuri* DSM 20345<sup>T</sup> rūšiai.



**3.1 pav.** *Staphylococcus* sp. 30-1 kamieno filogenetinė padėtis, analizuojant 16S rDNR sekas. Brūkšnys žymi 0,020 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA X programinis paketas, NJ metodas (Saitou and Nei, 1987).

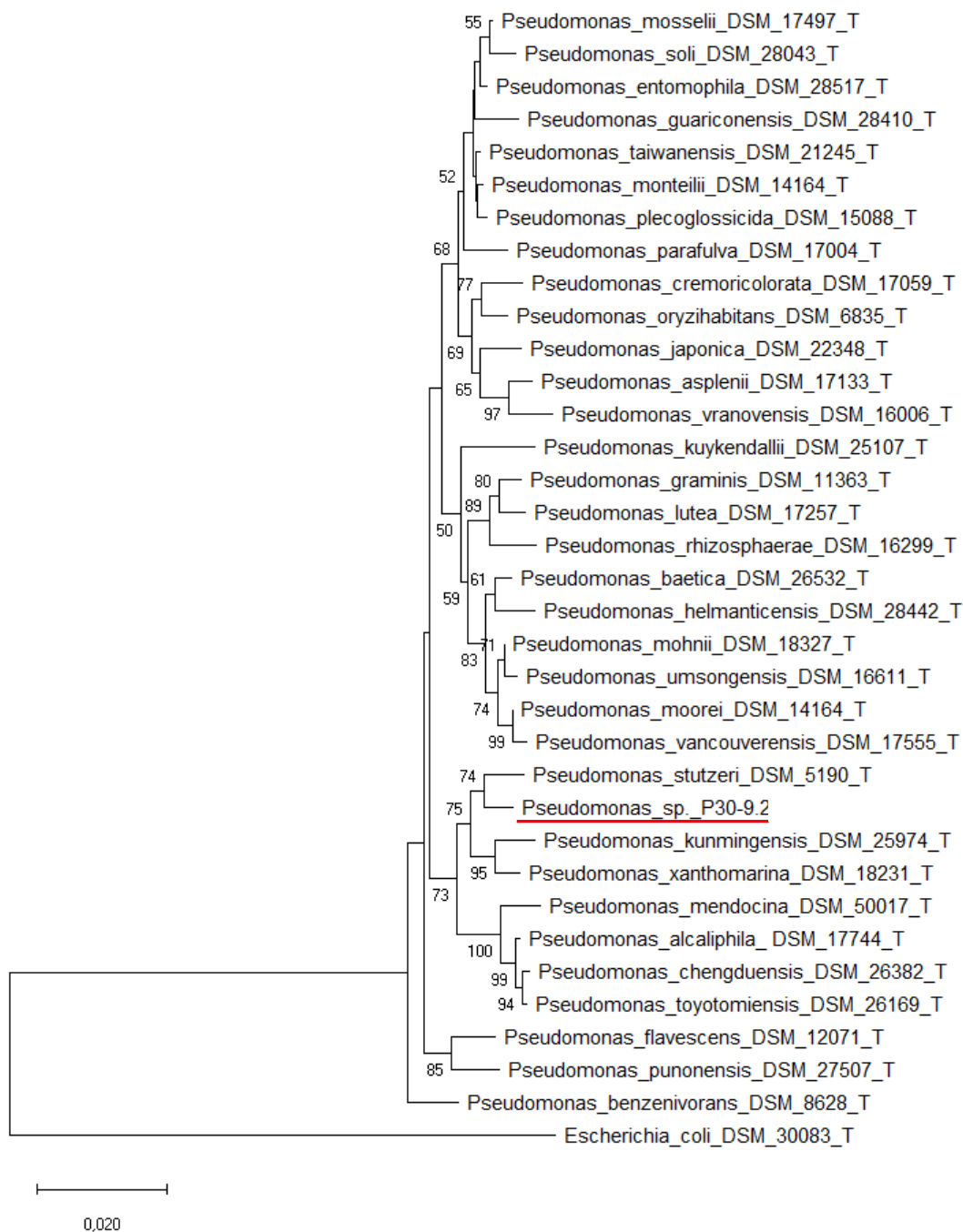
Išanalizavus P30–5 kamieną, naudojant BLASTn algoritmą (NCBI), nustatytas giminingumas *Brevundimonas olei* rūšiai (99,63 % panašumas). Ši rūšis yra aprašyta M. Lee ir kolegų paskelbtame darbe (Lee *et al.*, 2010), tačiau nėra oficialiai paskelbta. Nubraižyto filogenetinio medžio (3.2 pav.) analizė patvirtina P30-5 kamieno priklausomybę *Brevundimonas* genčiai ir turi didžiausią panašumą tipinei *Brevundimonas naejangsanensis* DSM 23858<sup>T</sup> rūšiai.



**3.2 pav.** *Brevundimonas* sp. P30-5 kamieno filogenetinė padėtis, analizuojant 16S rDNR sekas. Brūkšnyns žymi 0,020 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA X programinis paketas, NJ metodas (Saitou and Nei, 1987).

Atlikus kamieno P30–9.2 analizę, nustatytas giminingumas *Pseudomonas songnenensis* rūšiai (99,15 % panašumas). Ši rūšis aprašyta L. Zhang su kolegomis paskelbtame darbe (Zhang *et al.*, 2015), tačiau nėra oficialiai paskelbta. Nubraižytas

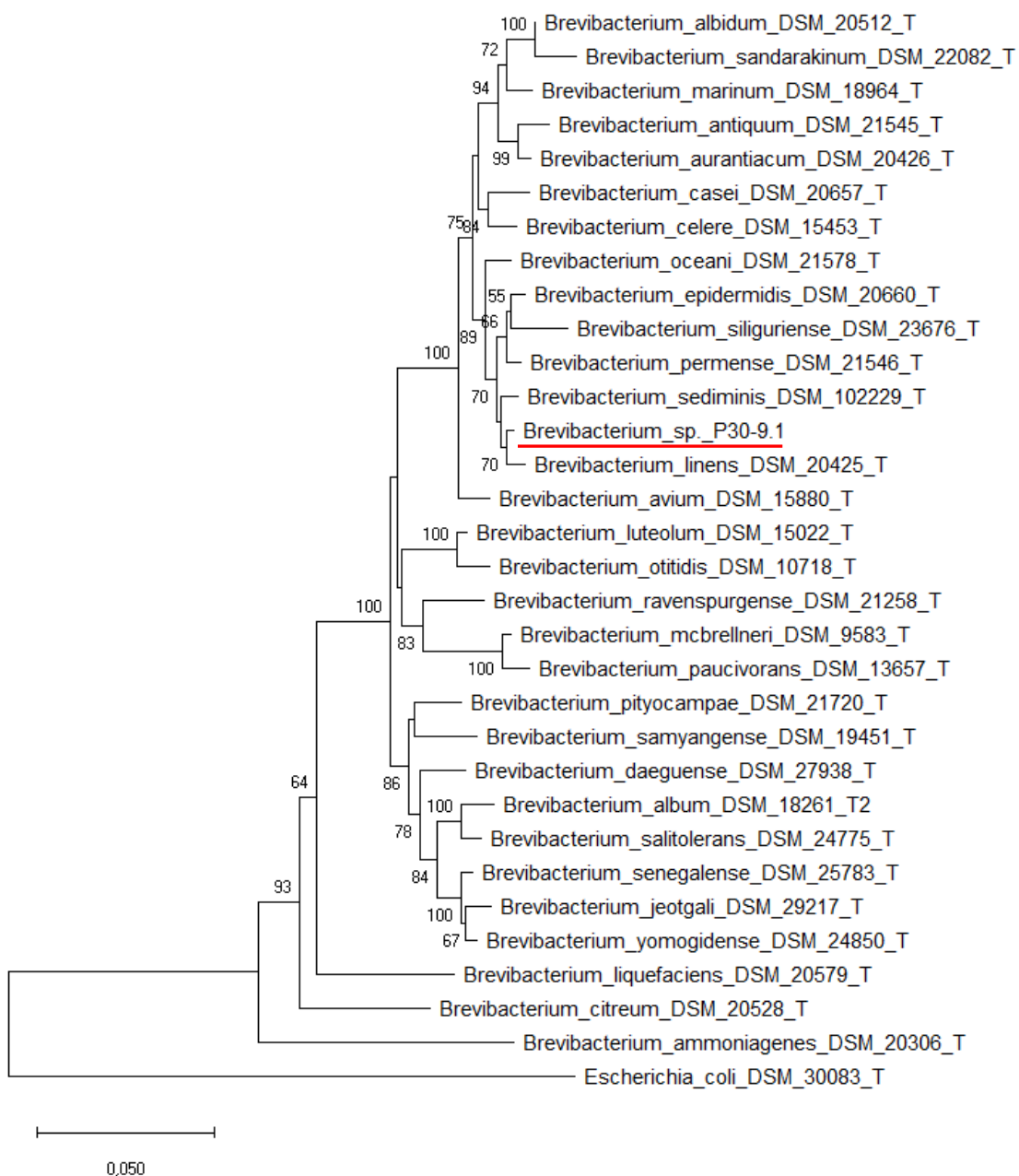
filogenetinis medis (3.3 pav.), kurio analizė patvirtina *Pseudomonas* sp P30–9.2 kamieno priklausomybę *Pseudomonas* genčiai ir turi didžiausią panašumą tipinei *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190<sup>T</sup> rūšiai.



**3.3 pav.** *Pseudomonas* sp. P30–9.2 kamieno filogenetinė padėtis, analizuojant 16S rDNR sekas. Brūkšnys žymi 0,020 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA X programinis paketas, NJ metodas (Saitou and Nei, 1987).

Atlikus kamieno P30–9.1 analizę, nustatytas giminingumas *Brevibacterium iodinum* rūšiai (98,48 % panašumas) (Collins et al. 1980). Nubraižytas filogenetinis medis (3.4 pav.), kurio analizė patvirtina *Brevibacterium* sp P30–9.1 kamieno priklausomybę *Brevibacterium* genčiai ir turi didžiausią panašumą tipinei *Brevibacterium linens* DSM 20425 rūšiai.





**3.4 pav.** *Brevibacterium* sp. P30-9.1 kamieno filogenetinė padėtis, analizuojant 16S rDNR sekas. Brūkšnyns žymi 0,10 nukleotidų pasikeitimą 1000 nukleotidų. Naudotas MEGA X programinis paketas, NJ metodas (Saitou and Nei, 1987).

### 3.2 Angliavandenilių degradacijos nustatymas

Nustatant mikroorganizmų angliavandenilių degradacijos lygį buvo naudojamas dujų chromatografijos metodas su liepsnos jonizacijos detektoriumi. Kartu su mėginiais vienodomis sąlygomis buvo inkubuojama kontrolė (terpė su nafta, be mikroorganizmų). Analizuojant chromatogramas, mėginių rezultatai lyginami su kontrole. Ant kontrolės chromatogramos uždedamos mėginių chromatogramos, taip vizualiai matomas angliavandenilių pokytis, atsiradęs dėl mikroorganizmų naftos degradacijos.

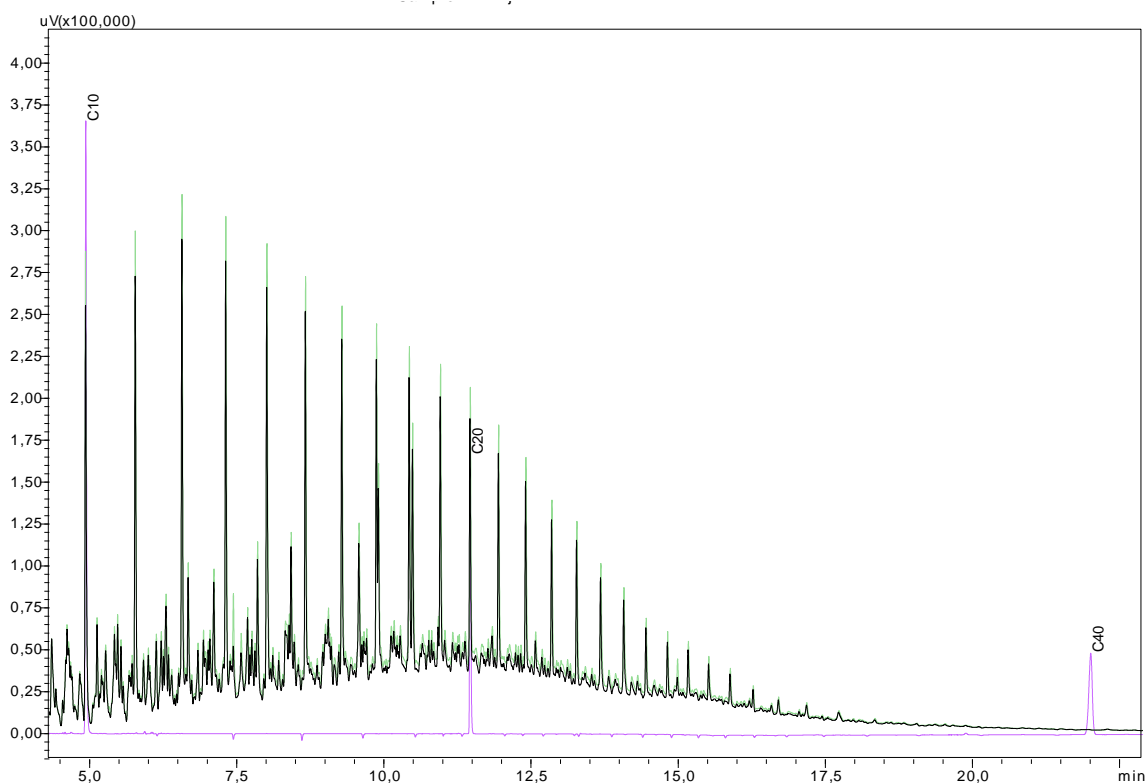
Lyginant mėginių rezultatus su kontrole, yra skaičiuojamas mikroorganizmų degradacijos procentas. Degradacijos rezultatai pateikti 3.2 lentelėje.

**3.2 lentelė.** Skirtingų mikroorganizmų naftos degradacijos rezultatai (proc.), mėginius inkubuojant 7 paras prie 30 °C temperatūros, Bushnell Haas druskų terpėje su 1 % valytos sterilios naftos.

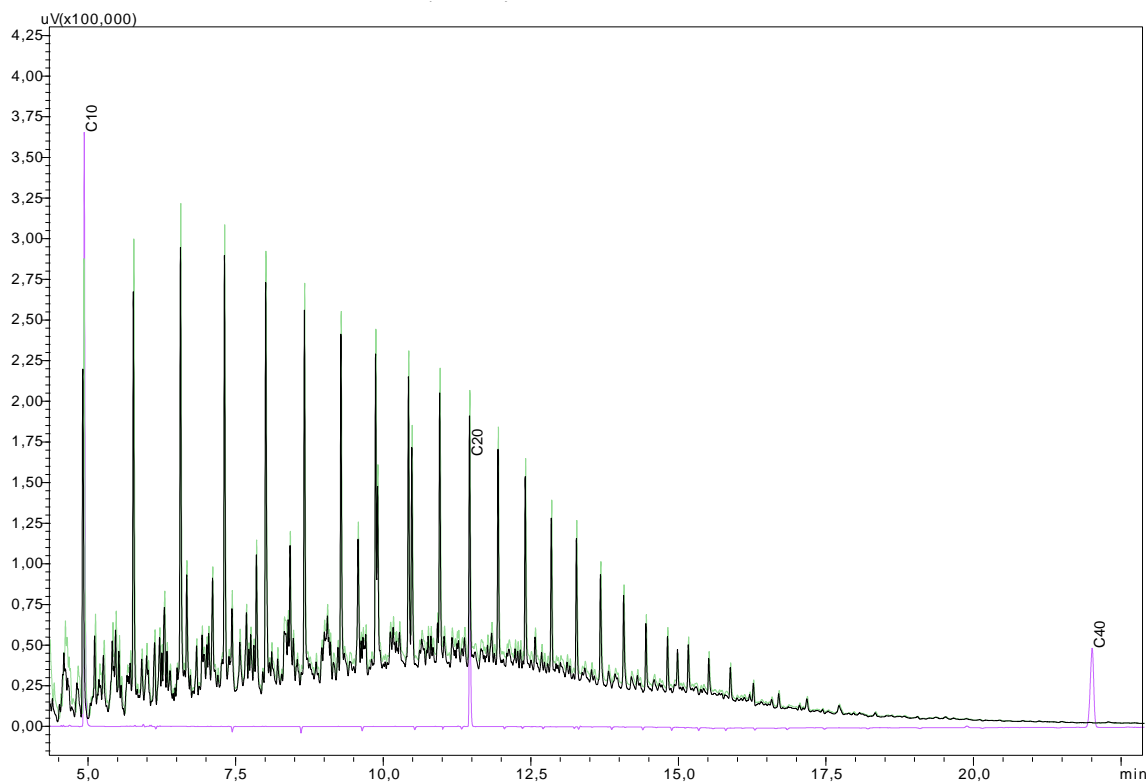
	Izoliatai				Visi mikroorganizmai kartu
	30-1	P30-5	P30-9.1	P30-9.2	
Degradacijos lygis (proc.)	5,2 %	8,7 %	5,1 %	7,2 %	2,4 %

### 3.2.1 Degradacijos proceso optimizavimas

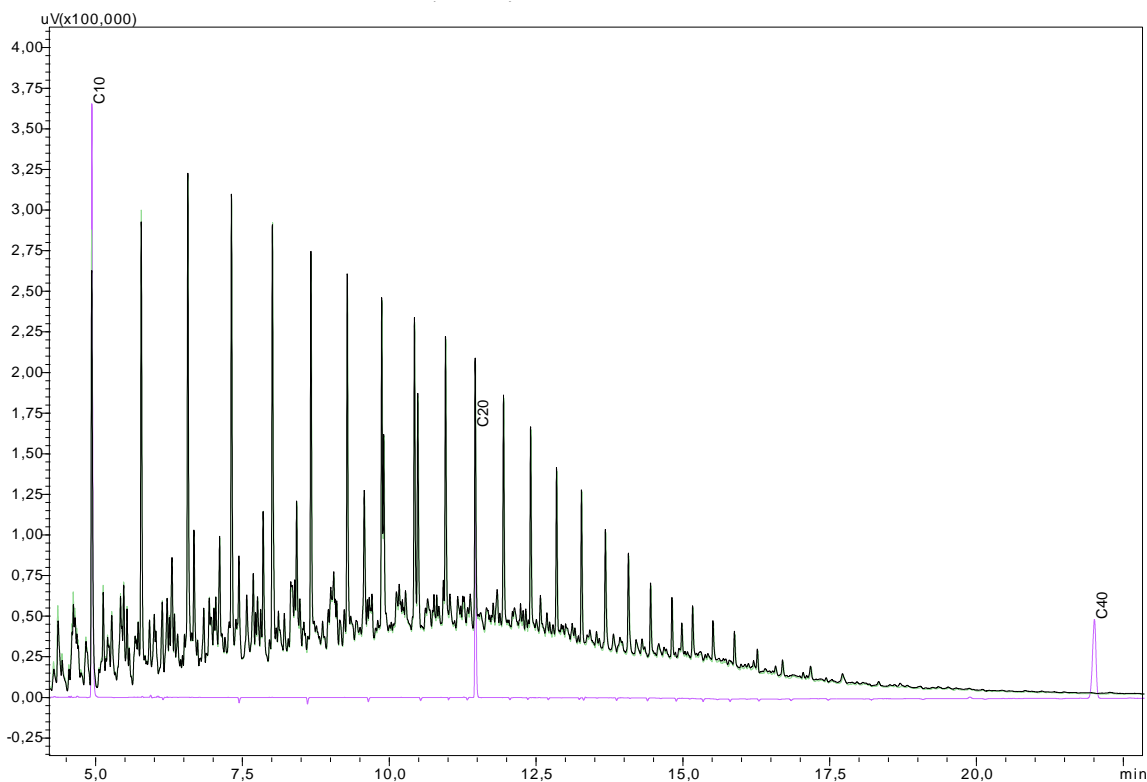
Atsižvelgiant į rezultatus, kurie parodė silpną mikroorganizmų naftos degradaciją, buvo panaudotos pridėtinės medžiagos, siekiant optimizuoti angliavandenilių skaidymo procesą. Mikroorganizmai buvo inkubuojami Bushnell Haas terpėje, papildomai pridėdant 0,01 % kompleksinio druskų mišinio (MgCl<sub>2</sub>, KCl, NSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>) bei 0,01 % mielių ir mėsos ekstrakto. Chromatogramos (3.5 pav., 3.6 pav., 3.7 pav., 3.8 pav.) vaizduoja angliavandenilių pokytį mėginiuose, lyginant su kontrole.



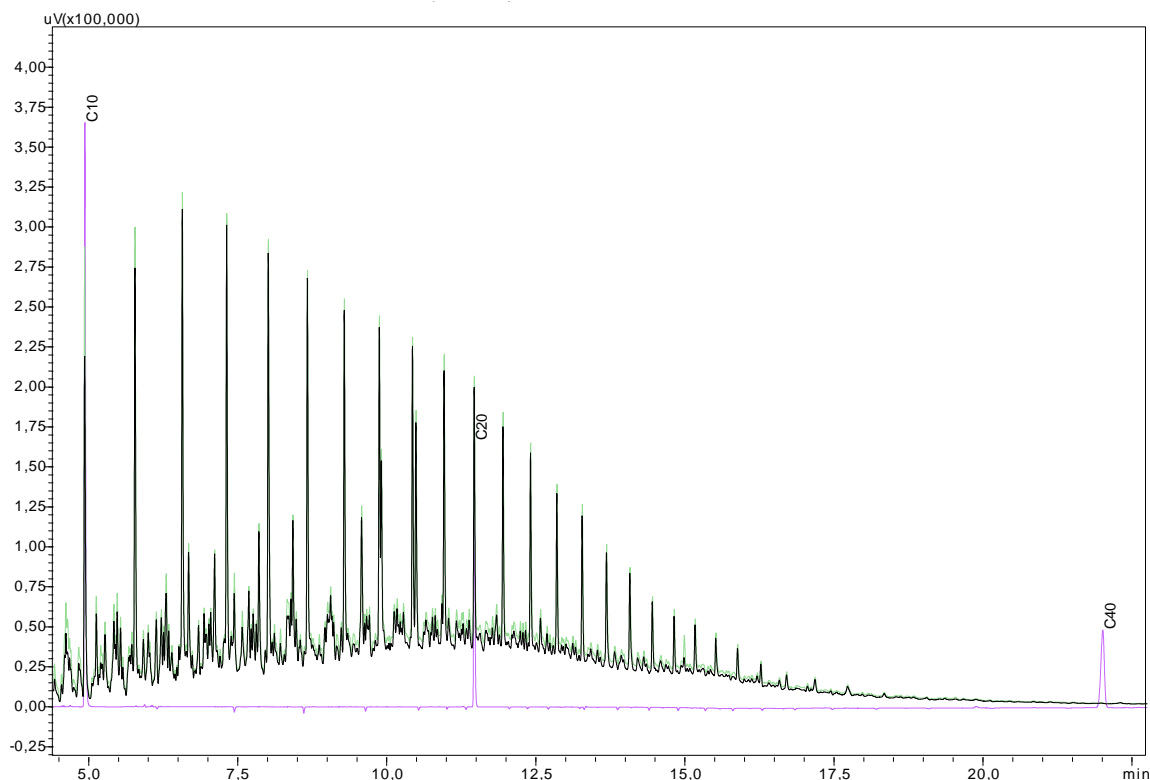
**3.5 pav.** *Pseudomonas* sp. P30-9.2 mikroorganizmo chromatograma. Juodos smailės žymi angliavandenilius esančius mėginyje, žalios smailės – kontrolę.



**3.6 pav.** *Staphylococcus* sp. 30–1 mikroorganizmo chromatograma. Juodos smailės žymi angliavandenilius esančius mėginyje, žalios smailės – kontrolę.



**3.7 pav.** *Brevibacterium* sp. P30–9.1 mikroorganizmo chromatograma. Juodos smailės žymi angliavandenilius esančius mėginyje, žalios smailės – kontrolę.



**3.8 pav.** *Brevundimonas* sp. P30–5 mikroorganizmo chromatograma. Juodos smailės žymi angliavandenilius esančius mėginyje, žalios smailės – kontrolę.

Lyginant mėginių rezultatus su kontrole, skaičiuojamas mikroorganizmų degradacijos procentas. Degradacijos rezultatai pateikti 3.3 lentelėje.

**3.3 lentelė.** Skirtingų mikroorganizmų naftos degradacijos rezultatai (proc.), mėginius inkubuojant 7 paras prie 30 °C temperatūros, Bushnell Haas druskų terpėje su 1 % valytos sterilios naftos, papildomai pridėdant 0,01 % kompleksinio druskų mišinio bei 0,01 % mielių ir mėsos ekstrakto.

	Izoliatai				Visi mikroorganizmai kartu
	30–1	P30–5	P30–9.1	P30–9.2	
<b>Degradacijos lygis (proc.)</b>	9,2 %	9,4 %	6,2 %	7,8 %	3,7 %

Siekiant optimizuoti mikroorganizmų naftos degradacijos procesus, buvo atliekami auginimai Bushnell Haas terpėje, papildomai pridėdant 0,01 % gliukozės. Po 7 parų inkubacijos, mėginiai tiriami chromatografijos metodu. Lyginant mėginių rezultatus su kontrole, skaičiuojamas mikroorganizmų degradacijos procentas. Degradacijos rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.

**3.4 lentelė.** Skirtingų mikroorganizmų naftos degradacijos rezultatai (proc.), mėginius inkubuojant 7 paras prie 30 °C temperatūros, Bushnell Haas druskų terpėje su 1 % valytos sterilios naftos, papildomai pridėdant 0,01 % gliukozės.

	<b>Izoliatai</b>				
	<b>30–1</b>	<b>P30–5</b>	<b>P30–9.1</b>	<b>P30–9.2</b>	<b>Visi mikroorganizmai kartu</b>
<b>Degradacijos lygis (proc.)</b>	9,8 %	9,9 %	6,4 %	9 %	6,95 %

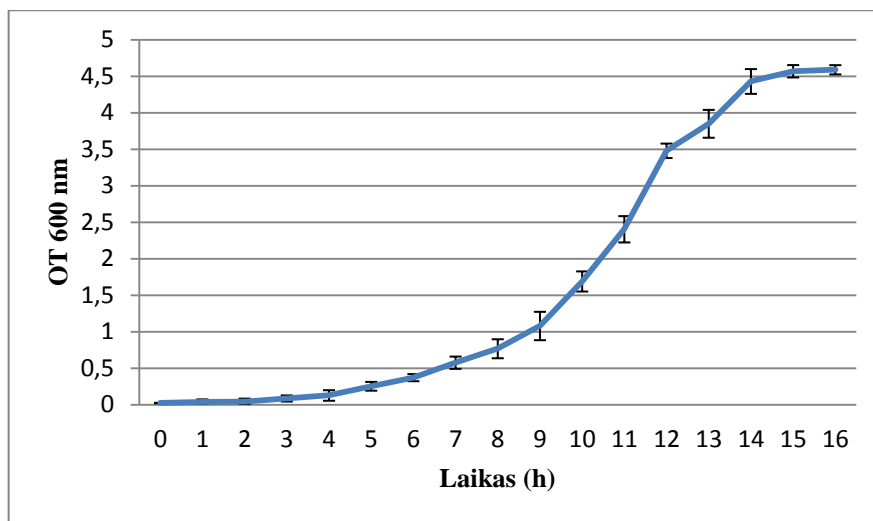
Siekiant optimizuoti mikroorganizmų naftos degradaciją, sumažint naftos paviršiaus įtempį, buvo naudojamas 50mg/L koncentracijos Triton X–100 surfaktantas. Mėginių rezultatai lyginami su kontrole, skaičiuojamas mikroorganizmų degradacijos procentas. Degradacijos rezultatai pateikti 3.5 lentelėje.

**3.5 lentelė.** Skirtingų mikroorganizmų naftos degradacijos rezultatai (proc.), mėginius inkubuojant 7 paras prie 30 °C temperatūros, Bushnell Haas druskų terpėje su 1 % valytos sterilios naftos, papildomai pridodant 50mg/L koncentracijos Triton X–100 surfaktanto.

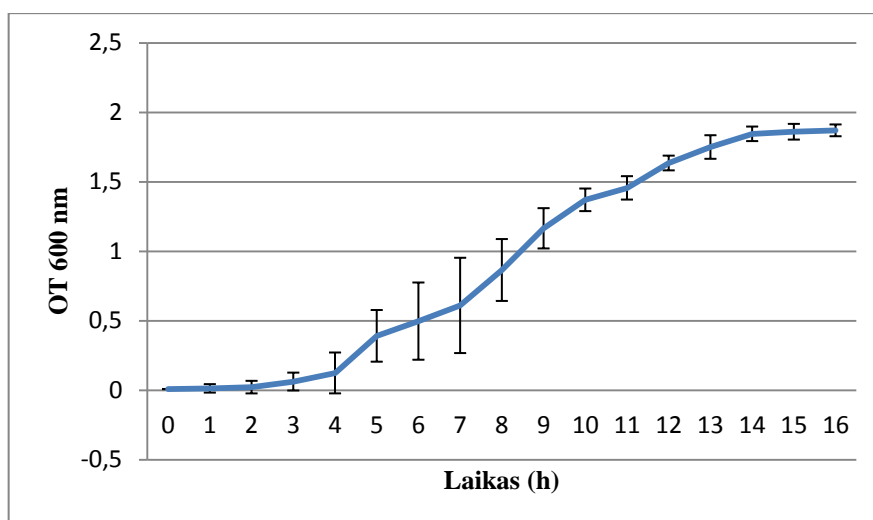
	<b>Izoliatai</b>				
	<b>30–1</b>	<b>P30–5</b>	<b>P30–9.1</b>	<b>P30–9.2</b>	<b>Visi mikroorganizmai kartu</b>
<b>Degradacijos lygis (proc.)</b>	13,8 %	16,2 %	9,6 %	16,8 %	11,6 %

### 3.2.2 Mikroorganizmų augimo analizė

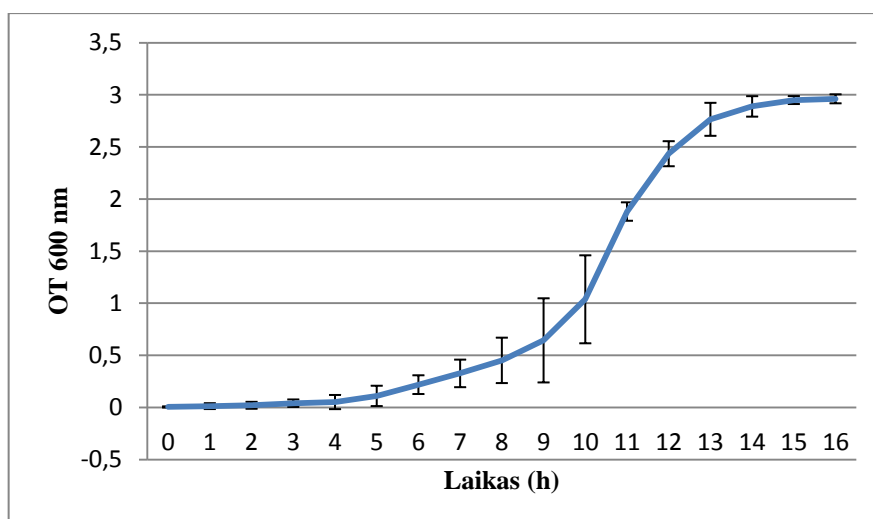
Atliekant naftos degradacijos tyrimus yra naudojamos pagausintos kultūros, kurios yra eksponentinėje augimo fazėje. Biosurfaktantų nustatymo tyrimams yra naudojamas mikroorganizmų, esančių stacionarioje augimo fazėje, supernatantas. Siekiant nustatyti mikroorganizmų augimo fazes buvo atlikta jų analizė, bei sudarytos augimo kreivės (3.9 pav., 3.10 pav., 3.11 pav., 3.12 pav.).



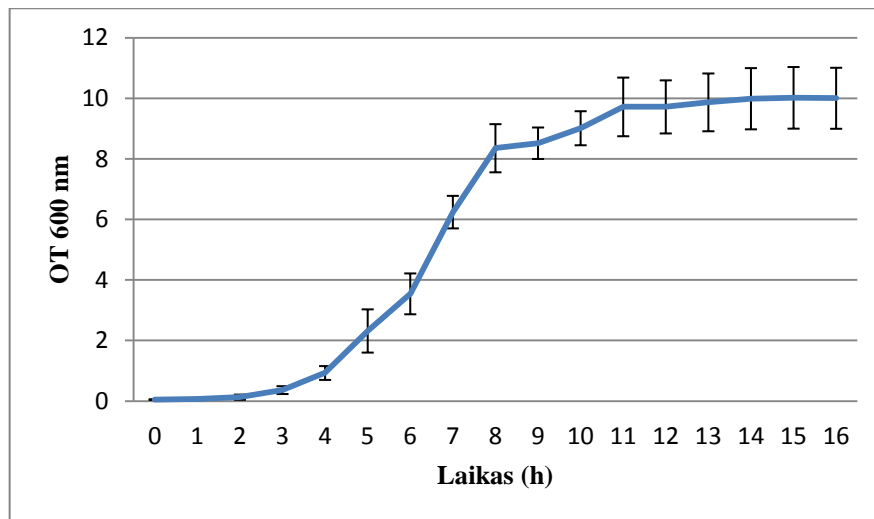
3.9 pav. Kamieno 30-9.1 augimo kreivė.



3.10 pav. Kamieno 30-9.2 augimo kreivė



3.11 pav. Kamieno 30-5 augimo kreivė.



3.12 pav. Kamieno 30–1 augimo kreivė.

### 3.3 Biosurfaktantų aktyvumo nustatymas

Darbe buvo panaudoti keli biosurfaktantų metodai, tokie kaip: emulsifikacijos aktyvumo nustatymo metodas ir naftos išstūmimo metodas.

#### 3.3.1 Emulsifikacijos aktyvumo nustatymo metodas

Atliekant emulsifikacijos aktyvumo nustatymo tyrimą, mėgintuvėliuose esantis supernatantas ir žibalas maišomi 2 min bei analizuojami vizualiai po 24 val. Skaičiuojamas emulsifikacijos indeksas ( $E_{24}$ ), pagal kurį yra vertinamas emulsifikacijos aktyvumas. Mikroorganizmų  $E_{24}$  rezultatai pateikti 3.6 lentelėje.

3.6 lentelė. Mikroorganizmų emulsifikacijos indekso ( $E_{24}$ ) rezultatai.

	Izoliatai			
	30–1	P30–5	P30–9.1	P30–9.2
<b>Emulsifikacijos indeksas (<math>E_{24}</math>)</b>	11,1 %	55,6 %	2,2 %	42,2 %

#### 3.3.2 Naftos išstūmimo metodas

Naftos išstūmimo tyrime yra vertinamas naftos, kurios plonas sluoksnis yra ant distiliuoto vandens paviršiaus, išstūmimas, sukeltas dėl supernatante esančių biosurfaktantų. Didesnis biosurfaktantų kiekis sukelia didesnį naftos išstūmimą. Kontrolę sudarė vandens lašas užlašintas ant naftos. Skaičiuojamas naftos išstūmimo (paviršiuje susiformavusio

skaidrus apskritimo) plotas ( $S = \pi r^2$ ). Mikroorganizmų naftos išstūmimo rezultatai pateikti 3.7 lentelėje.

**3.7 lentelė.** Naftos išstūmimo rezultatai.

	<b>Izoliatai</b>			
	<b>30-1</b>	<b>P30-5</b>	<b>P30-9.1</b>	<b>P30-9.2</b>
<b>Naftos išstūmimo paviršiaus plonas</b>	0,58 cm <sup>2</sup>	0,81 cm <sup>2</sup>	0,45 cm <sup>2</sup>	0,98 cm <sup>2</sup>



## 4 REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tiriamas mikroorganizmų, išskirtų iš nafta užteršto dirvožemio, gebėjimas degraduoti naftos produktus bei šio proceso optimizavimas. Taip pat, atkreipiamas dėmesys į mikroorganizmų sintetinius biosurfaktantus, kurie tiesiogiai susiję su naftos produktų degradacijos procesu.

Atrinkti 4 izoliatai (30–1; P30–5; P30–9.1; P30–9.2), pasižymintys aktyviausiu augimu, inkubuojant terpėje su nafta. Šių izoliatų skaičius, inkubuojant 3 paras, padidėjo 2 – 5 eilėmis. Iš mikroorganizmų skaičiaus didėjimo terpėje, kurioje nafta sudarė vienintelį anglies šaltinį, galima spręsti, jog šios bakterijos geba skaidyti naftos angliavandenilius iki mebatolinių junginių, kuriuos panaudoja trikarboksirūgšties cikle energijai pasigaminti.

Farag ir kolegų publikuotame darbe (Farag *et al.*, 2018) taip pat buvo atliekama išskirtų mikroorganizmų atranka auginant terpėje su nafta, tačiau tyrime taikomas iš pradžių auginimas skystoje terpėje (3 parom ilgiau, negu šiame darbe), o paskui vertinamas augimo greitis ant standžios terpės su nafta (inkubacija: 3 paros). Autoriai teigia, jog dauguma išskirtų mikroorganizmų geba skaidyti naftos angliavandenilius, bet tik keli iš jų geba efektyviai degraduoti angliavandenilius, todėl svarbu juos atrinkti, kad tolimesnius tyrimus taikyti tik su aktyviausiais mikroorganizmais. Siekiant patobulinti atliktą tyrimą, būtų galima padidinti inkubacijos laikotarpį skystoje terpėje su nafta, iki 6 parų, kaip nurodyta paminėtame darbe.

*Staphylococcus* sp. 30–1 kamienas turi didžiausią panašumą *Staphylococcus lentus* rūšiai. Agbaji ir kolegų (Agbaji *et al.*, 2020) atliktame darbe, kurio tikslas – konsorciumo gebančio degraduoti naftos užterštą dirvožemį optimizavimas, vienas iš išskirtų efektyviausių mikroorganizmų – *Staphylococcus lentus*. Tai patvirtina šio kamieno gebėjimą efektyviai degraduoti naftą.

*Brevibacterium* sp. P30–9.1 kamienai nustatytas giminingumas *Brevibacterium iodinum* rūšiai. Emtiyazjoo ir kolegų (Emtiyazjoo *et al.*, 2014) atliktame darbe, kuriame iš nafta užteršto dirvožemio išskirtas bei identifikuotas *Brevibacterium iodinum*. Atliktame darbe buvo ištirtas šio mikroorganizmo gebėjimas degraduoti angliavandenilius iki 59 %. Tyrimo rezultatai patvirtina šiame darbe tiriamo mikroorganizmo gebėjimą degraduoti naftos angliavandenilius.

*Pseudomonas* sp. P30–9.2 kamienai nustatytas giminingumas *Pseudomonas songnenensis* rūšiai, kuris oficialiai nėra paskelbtas. Ali ir kolegų (Ali *et al.*, 2020) atliktame darbe, kuriame tiriamas išskirtų mikroorganizmų gebėjimas degraduoti naftos angliavandenilius, vienas iš tiriamų mikroorganizmų yra *Pseudomonas songnenensis*. Atliktame darbe ištirta, jog šis mikroorganizmas yra tolerantiškas naftai bei geba skaidyti

angliavandenilius. Tai patvirtina šiame darbe tiriamo mikroorganizmo *Pseudomonas* sp. P30–9.2 gebėjimą degraduoti naftos angliavandenilius.

Šiame darbe tiriamam *Brevundimonas* sp. P30–5 kamienui nustatytas giminingumas *Brevundimonas olei* rūšiai, kuris oficialiai nėra paskelbtas. Smulek ir kolegų (Smulek *et al.*, 2020) atliktame darbe, kuriame tirama policiklinių aromatinių angliavandenilių biodegradacija, ištirta jog iš dirvožemio mėginio išskirtas ir identifikuotas *Brevundimonas olei* geba degraduoti policiklinius aromatinus angliavandenilius, o degradacija gali siekti 76 % inkubuojant 28 dienas.

Silpnai vykusiai angliavandenilių biodegradacijai galėjo turėti įtakos parinktas inkubacijos laikas (7 paros). Tai sąlyginai trumpas inkubacijos laikotarpis, lyginant su kitais atliekamais darbais. Smulek ir kolegų (Smulek *et al.*, 2020) atliktame darbe, degradacijos procesas vyksta 28 d., o Ali ir kolegų (Ali *et al.*, 2020) ištirtame darbe, užteršto dirvožemio angliavandenilių skaidymo procesas vyko 6 mėn. Kitų autorių darbuose 7 parų inkubacijos laikotarpis yra naudojamas daugelyje biodegradacijos tyrimų, todėl toks inkubacijos laikotarpis buvo pasirinktas ir šitame darbe, taip pat toks sąlyginai trumpas laiko tarpas leidžia atlikti daugiau tyrimų. Taip pat silpnas degradacijos procesas galėjo būti dėl pridėtinių medžiagų nebuvimo.

Tyrimo rezultatai, naudojant papildomai mielių ekstraktą (0,01 %), mėsos ekstraktą (0,01 %) bei kompleksinį druskų mišinį (0,01 %), lyginant su degradacijos rezultatais atliktais be pridėtinių medžiagų, padidėjo apytiksliai 4 %. Aktyviausia degradacija buvo fiksuojama mėginyje su P30–5 izoliatu, o mažiausia – mėginyje su visais mikroorganizmais kartu. Lyginant šio tyrimo rezultatus su Soha Farag ir kolegų (Farag *et al.*, 2018) atlikto darbo rezultatais, pastebėta, jog rezultatai skyriasi. Nustatyta, jog inkubuojant mėginius druskų terpėje su 1 % naftos bei 0,1 % mielių ekstrakto, degradacija pasiekė 26,4 %.

Lyginant tyrimo rezultatus, gautus naudojant gliukozę (0,01 %), su rezultatais gautais inkubuojant mėginius be pridėtinių medžiagų, angliavandenilių degradacija padidėjo apytiksliai 4,5 %. Lyginant šio tyrimo rezultatus su Soha Farag ir kolegų (Farag *et al.*, 2018) darbo rezultatais, nustatyta, jog rezultatai skyriasi: inkubuojant mėginius druskų terpėje su 0,1 % gliukozės, degradacija siekia 29,5 %, o naudojant 0,1 % mielių ekstrakto bei 0,1 % gliukozės – 38,6 %. Galima spręsti, jog Soha Farag ir kolegų (Farag *et al.*, 2018) atliktame darbe degradacijos rezultatai yra didesni, dėl didesnio pridėtinių medžiagų naudojamo kiekio.

Lyginant tyrimo rezultatus, naudojant Triton X-100 (0,05 %), su rezultatais gautais inkubuojant mėginius be pridėtinių medžiagų, rezultatai padidėjo apytiksliai 10 %. Lyginant šio tyrimo rezultatus su Soha Farag ir kolegų (Farag *et al.*, 2018) darbo rezultatais, pastebėta, jog rezultatai skiriasi: inkubuojant mėginius su 0,1 % Triton X-100, degradacija siekia 57,23

%). Galima spręsti, jog Soha Farag ir kolegų (Farag *et al.*, 2018) atliktame darbe degradacijos rezultatai yra didesni, dėl didesnio pridėtinių medžiagų naudojamo kiekio.

Aptariant emulsifikacijos aktyvumo rezultatus, pastebėta, jog kamienai turintys didžiausią emulsifikacijos aktyvumą, taip pat pasiekė didžiausią degradacijos rezultata. Parthipan su kolegomis (Parthipan *et al.*, 2017) savo darbe ištyrė, jog *Bacillus subtilis* A1, kuris produkuoja labai didelį kiekį biosurfaktantų, taip pat geba efektyviai degraduoti naftos angliavandenilius (degradacija siekia 87 %). Tai patvirtina, jog bakterijos sintetinančios didesnį kiekį biosurfaktantų, geba taip pat efektyviai degraduoti naftos angliavandenilius.

Atliekant naftos išstūmimo tyrimą, šio metodo rezultatai pasitvirtino su emulsifikacijos aktyvumo rezultatais, tuo pačiu patvirtinant biosurfaktantų aktyvumo nustatymo rezultatų tikslumą. Šie rezultatai taip pat pasitvirtina su Parthipan ir kolegų (Parthipan *et al.*, 2017) darbe atlikto naftos išstūmimo metodo rezultatais.

## 5 NUMATYTI EKSPERIMENTAI

Dėl šalyje susiklosčiusių sąlygų, nebuvo galimybės atlikti kai kurių darbe numatytų eksperimentų. Šiame skyriuje aprašyti visi numatyti tyrimai bei pateikti jų rezultatai, kokius tikėtasi gauti.

### 5.1 Naftos ar jos produktų degradacijos optimalių sąlygų nustatymas

Vienas iš pagrindinių šio darbo uždavinių – nustatyti naftos ar jos produktų degradacijos optimalias sąlygas. Šiam uždaviniui pasiekti, buvo naudojamos pridėtinės medžiagos, tokios kaip mielių ekstraktas, mėsos ekstraktas, druskų kompleksinis mišinys, gliukozė bei Triton X–100. Šių medžiagų naudojimas padidino angliavandenilių biodegradaciją 4,5 – 9,6 %, tačiau, buvo numatyti dar keli sąlygų pakeitimai, kurie galėtų turėti įtakos degradacijos proceso optimizavimui: skirtingo naftos kiekio bei pridėtinių medžiagų panaudojimas.

#### 5.1.1 Skirtingo naftos kiekio panaudojimas degradacijos procesui optimizuoti

Farag ir kolegų atliktame darbe (Farag *et al.*, 2018) teigiama, jog skirtingi naftos kiekiai, panaudoti biodegradacijai, turi įtakos šio proceso intensyvumui, todėl nuspręsta atlikti eksperimentus, naudojant skirtingą naftos koncentraciją.

Numatyta atlikti biodegradacijos tyrimus, inkubuojant izoliatus Bushnell Haas druskų terpėje, naudojant skirtingas naftos koncentracijas: 0,2 %; 0,5 %; 0,75 %; 1 %; 1,5 %. Mėginiai bei mėginių kontrolė (terpė su nafta, be mikroorganizmų) inkubuojami 7 paras purtyklėje prie 30 °C temperatūros ir 160 aps./min. greičiu. Po inkubacijos laikotarpio, mėginiai tiriami dujų chromatografijos metodu. Mėginių chromatogramos lyginamos su kontrolės chromatograma bei skaičiuojami degradacijos rezultatai. Šie rezultatai lyginami tarpusavyje, siekiant nustatyti optimaliausią naftos koncentraciją, kurioje biodegradacija vyksta efektyviausiai. Farag ir kolegų atliktame darbe (Farag *et al.*, 2018) nustatyta, jog vienas iš didžiausių angliavandenilių biodegradacijos rezultatų buvo pasiektas naudojant 1 % naftos, o didžiausias – naudojant 0,2 % naftos.

Šiame tyrime tikimasi gauti panašius rezultatus, kaip ir aukščiau paminėtame darbe. Degradacijos rezultatai paversti į procentus būtų pateikti lentelėje. Nustačius optimaliausią naftos koncentraciją degradacijos procesui, ši koncentracija būtų naudojama tolimesniems tyrimams.

### 5.1.2 Pridėtinių medžiagų naudojimas ir angliavandenilių degradacija

Šiame darbe buvo naudojamos tokios pridėtinės medžiagos kaip: mielių ekstraktas (0,01 %), mėsos ekstraktas (0,01 %), druskų kompleksinis mišinys (0,01 %), gliukozė (0,01 %), bei Triton X–100. Farag ir kolegų atliktame darbe (Farag *et al.*, 2018) nustatyta, jog naudojant 0,5 % gliukozę kartu su 0,5 % mielių ekstraktu, degradacija vyksta efektyviausiai. Taip pat šios medžiagos naudojamos atskirai, bet degradacija nepasiekia tokio efektyvumo.

Remiantys aukščiau paminėto tyrimo metodika, siekiant padidinti degradacijos efektyvumą, nuspręsta į Bushnell Haas druskų terpę papildomai pridėti 0,5 % gliukozės ir 0,5 % mielių ekstrakto bei patikrinti biodegradacijos efektyvumą, naudojant šias pridėtines medžiagas atskirai. Taip pat nuspręsta patikrinti biodegradacijos efektyvumą, inkubuojant mėginius su šiomis pridėtinėmis medžiagomis, didinant koncentracijas iki 2 % (0,5 %; 1 %; 1,5 %; 2 %). Inkubacija vyktų nekeičiant anksčiau minėtų inkubacijos sąlygų (7 paras purtyklėje prie 30 °C temperatūros ir 160 aps./min. greičiu). Po 7 parų mėginius analizuojant dujų chromatografijos metodu, rezultatai vertinami mėginių chromatogramas lyginant su kontrole. Paskaičiuojamas degradacijos procentas. Rezultatai būtų pateikti lentelėje.

## 5.2 Biosurfaktantų analizė

Siekiant detaliau ištirti tiriamų mikroorganizmų produkuojamus biosurfaktantus, buvo numatyta atlikti plonasluoksnės chromatografijos metodą.

### 5.2.1 Plonasluoksnės chromatografijos metodas

Siekiant atlikti biosurfaktantų išsamesnę analizę, buvo numatyta atlikti plonasluoksnės chromatografijos metodą. Plonasluoksnė chromatografija (TLC) – tai atskyrimo metodas, skirtas tiek kokybinei, tiek kiekybinei analizei, leidžiantis vienu metu per trumpą laiką išanalizuoti skirtingas medžiagas. Šiuo tyrimo metu plonas sorbento sluoksnis paskleidžiamas ant plokštelės, kuri tarnauja kaip tiriamojo mėginio nešimo priemonė (Matukaiytė, 2013).

Remiantys Dlamini ir kolegų atlikto darbo (Dlamini *et al.*, 2020) parinkta metodika, būtų atlikta plonasluoksnė chromatografija ant silikagelio 60 F254 plokštelių, o judriąją fazę sudarytų chloroformas, metanolis ir vanduo 65: 25: 4 santykiu. Izoliatai inkubuojami 30 °C temperatūroje prie 150 aps./min. greičiu, apie 60 val. Mikroorganizmų supernatantuose išsiskyrę biosurfaktantai sukonzentruojami, juos nusodinant rūgštimi. Po inkubacijos supernatantas centrifuguojamas 30 min., 4400 aps./min. greičiu, 25 °C temperatūroje. Po to

supernatantas koncentruojamas pridedant 6 % HCl tirpalą, kol supernatantas tampa 2 pH bei vėl centrifuguojamas (10 min., 4400 aps./min., 25 °C temperatūroje). Sukoncentruotas supernatantas džiovinamas termostate prie 37 °C temperatūros apie 2 dienas. Po išdžiovinimo atliekamas praskiedimas su 8 pH NaOH tirpalu. Paruošti mėginiai po 1 µL užnešami ant plokštelės. Po to plokštelė su mėginiais dedama į judriąją fazę. Mėginiams numigravus apie 9,5 cm, plokštelės išimamos iš kameros ir išdžiovinamos. Po džiovinimo plokštelės apipurškiamos 0,005 % primulino dažų, ištirpintu 80 % acetono tirpale, kad mėginyje būtų vizualizuoti esantys biosurfaktantai. Aptariant rezultatus, būtų pateikta chromatogramos nuotrauka.

## IŠVADOS

1. Iš nafta užteršto dirvožemio mėginio, buvo išskirti 27 vizualiai skirtingi izoliatai, iš kurių buvo atrinkti ir identifikuoti 4 izoliatai: (*Staphylococcus* sp. 30–1; *Brevundimonas* sp. P30–5; *Brevibacterium* sp. P30–9.1; *Pseudomonas* sp. P30–9.2).
2. Modifikuota ir pritaikyta naftos degradacijos nustatymo metodika, tinkanti tikslinių mikroorganizmų tyrimams
3. Nustatyta, jog pridėtinės medžiagos (mielių ekstraktas, mėsos ekstraktas, kompleksinis druskų mišinys, gliukozė, Triton X–100) bei pasirinkta šių medžiagų koncentracija, padidina degradacijos procesą 4,5 – 9,6 %.
4. Iš atliktų biosurfaktantų nustatymo metodų (emulsifikacijos aktyvumo nustatymo metodas, naftos išstūmimo metodas) nustatyta, kad tiriami mikroorganizmai sintetina biosurfaktantus.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Valentina Matušova  
Magistro baigiamasis darbas

**Naftos produktų degradacijos nustatymas ir proceso optimizavimas**

SANTRAUKA

Naftos ir jos produktų biodegradacija vyksta dėl mikroorganizmų gebėjimo skaidyti naftos angliavandenilius iki nekenksmingų metabolinių produktų. Šio darbo tikslas nustatyti naftos degradaciją atrinktuose mikroorganizmuose bei optimizuoti šį procesą. Tam, kad pasiekti šį tikslą, iš nafta užteršto dirvožemio mėginio buvo išskirti 27 vizualiai skirtingi izoliatai, iš kurių atrinkti 4 izoliatai (30–1; P30–5; P30–9.1; P30–9.1). Nustatyta atrinktų mikroorganizmų filogenetinė priklausomybė (*Staphylococcus* sp. 30–1; *Brevundimonas* sp. P30–5; *Brevibacterium* sp. P30–9.1; *Pseudomonas* sp. P30–9.2). Naftos degradacijos nustatymo metodikos modifikavimas leido tirti tokio tipo mėginius bei analizuoti rezultatus, naudojant dujų chromatografijos metodą. Norint pasiekti efektyvesnę mikroorganizmų degradaciją, buvo atliekami tyrimai nustatant optimalias biodegradacijos sąlygas. Šiems tyrimams buvo panaudotos pridėtinės medžiagos (mielių ekstraktas, mėsos ekstraktas, kompleksinis druskų mišinys, gliukozė, Triton X–100), kurios padidino degradacijos procesą 4,5 – 9,6 %. Siekiant nustatyti, ar tiriami mikroorganizmai sintetina paviršiaus aktyviasias medžiagas, buvo atlikti biosurfaktantų nustatymo metodai (emulsifikacijos aktyvumo nustatymo metodas, naftos išstūmimo metodas) bei nustatyta, kad tiriami mikroorganizmai sintetina biosurfaktantus.



VILNIUS UNIVERSITY  
LIFE SCIENCES CENTER  
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Valentina Matušova  
Master thesis

**The Degradation of Crude Oil Products and Process Optimization**

SUMMARY

Crude oil products are able to be degraded via the ability of microorganisms to decompose hydrocarbons into harmless metabolic products. This work focuses on recognizing the degradation process of crude oil products through the medium of selected microorganisms and how such processes can be optimized. To accomplish the determined goal; twenty-seven visually different isolates have been selected from a sample of crude oil contaminated soil. Four main isolates have been selected for the experiment: (30-1; P30-5; P30-9.1; P30-9.1). The isolates were determined to belong to the *Staphylococcus* sp. (30-1), *Brevundimonas* sp. (P30-5), *Brevibacterium* sp. (P30-9.1), and *Pseudomonas* sp. (P30-9.2). A modified technique is presented to determine the degradation of crude oil products using gas chromatography. To optimize the degradation processes, further research has been done to determine the optimal conditions for biodegradation. This included the addition of different components such as: yeast extract, meat extract, salt mixture, glucose and Triton X-100. The results have demonstrated an increase in the degradation processes which varied from 4.5 % to 9.6 %. Furthermore, surfactant establishing methods such as; the emulsification activity method and the crude oil displacement method have been used to detect whether the test-subject microorganisms synthesize the surface active agents. It was recognized that investigated microorganisms synthesize biosurfactants.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Audriui Gegeckui už galimybę atlikti šį darbą, už rūpestį, supratingumą, palaikymą bei už skirtą laiką.

Dėkoju Justinai Jurgelevičiūtei bei dr. Arnoldui Kauniečiui už konsultacijas bei pagalbą atliekant laboratorinius darbus.

Esu dėkinga savo šeimai, už nuolatinį tikėjimą bei palaikymą.

## LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu R, 2015. A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 176, 670–99. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>.
2. Agbaji JE, Nwaichi EO, Abu GO, 2020. Optimization of Bioremediation-Cocktail for Application in the Eco-Recovery of Crude Oil Polluted Soil. *AAS Open Research*. 3, 7. <https://doi.org/10.12688/aasopenres.13028.1>.
3. Ali N, Dashti N, Khanafer M, et al., 2020. Bioremediation of Soils Saturated with Spilled Crude Oil. *Scientific Reports*. 10, 1116. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57224-x>.
4. Bian X, Mbadinga SM, Liu YF, et al., 2015. Insights into the Anaerobic Biodegradation Pathway of n -Alkanes in Oil Reservoirs by Detection of Signature Metabolites. *Scientific Reports*. 5, 9801. <https://doi.org/10.1038/srep09801>.
5. Boll M, Estelmann S, Heider J, 2020. Catabolic Pathways and Enzymes Involved in the Anaerobic Degradation of Monocyclic Aromatic Compounds. In *Anaerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, edited by Matthias Boll, 85–133. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50391-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50391-2_6).
6. Boukir A, Aries E, Guiliano M, et al., 2001. Subfractionation, Characterization and Photooxidation of Crude Oil Resins. *Chemosphere*. 43, 279–86. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00159-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00159-4).
7. Brown DM., Bonte M, Gill R, et al., 2017. Heavy Hydrocarbon Fate and Transport in the Environment. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*. 50, 333–46. <https://doi.org/10.1144/qjegh2016-142>.
8. Chandra S, Sharma R, Singh K, Sharma A, 2013. Application of Bioremediation Technology in the Environment Contaminated with Petroleum Hydrocarbon. *Annals of Microbiology*. 63, 417–31. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0543-3>.
9. Clements T, Ndlovu T, Khan S, and Khan W. 2019. Biosurfactants Produced by *Serratia* Species: Classification, Biosynthesis, Production and Application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9520-5>.
10. Collins MD, Jones D, Keddie RM, Sneath PHA, 1980. Reclassification of *Chromobacterium Iodinum* (Davis) in a Redefined Genus *Brevibacterium* (Breed) as

- Brevibacterium Iodinum Nom.Rev.; Comb.Nov. *Microbiology*. 120, 1–10.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-120-1-1>.
11. Costa AS, Romão LPC, AraújoBR, et al., 2012. Environmental Strategies to Remove Volatile Aromatic Fractions (BTEX) from Petroleum Industry Wastewater Using Biomass. *Bioresource Technology*. 105, 31–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.096>.
  12. Deborah GSA, Thatheyus AJ, 2018. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Overview. In *Microbial Action on Hydrocarbons*, edited by Vivek Kumar, Manoj Kumar, and Ram Prasad, 485–503. Singapore: Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_19).
  13. Demirbas A, Taylan O, 2016. Removing of Resins from Crude Oils. *Petroleum Science and Technology*. 34, 771–77.  
<https://doi.org/10.1080/10916466.2016.1163397>.
  14. Dlamini B, Rangarajan V, Clarke KG, 2020. A Simple Thin Layer Chromatography Based Method for the Quantitative Analysis of Biosurfactant Surfactin Vis-a-Vis the Presence of Lipid and Protein Impurities in the Processing Liquid. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 25, 101587. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101587>.
  15. Farag S, Soliman N, Abdel-Fattah YE, 2018. Statistical Optimization of Crude Oil Bio-Degradation by a Local Marine Bacterium Isolate Pseudomonas Sp. Sp48. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 16, 409–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.01.001>.
  16. Fingas M, 2015. *Handbook of Oil Spill Science and Technology*.
  17. Fuchs G, 2008. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125, 82–99. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.010>.
  18. Fuchs G, Boll M, Heider J, 2011. Microbial Degradation of Aromatic Compounds- from One Strategy to Four. *Nature Reviews Microbiology*. 9, 803–16.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2652>.
  19. Greičiūnaitė V. Mikroemulsijų su propolio fenoliais junginiais modeliavimas ir biofarmacinis vertinimas [magistrinis darbas]. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas; 2018.
  20. Grigiškis, S, 2011. *Kompleksinių biotechnologinių procesų kūrimo ir taikymo aplinkosaugoje tyrimai*. Vilnius: Vilniaus Gedimino technikos universitetas.  
<https://doi.org/10.20334/1901-M>.

21. Grossi, V, Cravo-Laureau C, Guyoneaud R, et al., 2008. Metabolism of N-Alkanes and n-Alkenes by Anaerobic Bacteria. *Organic Geochemistry*. 39, 1197–1203. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.02.010>.
22. Gupte A, Tripathi A, Patel H, et al., 2016. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs): A Perspective. *The Open Biotechnology Journal*.10. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010363>.
23. Imron MF, Titah HS, Imron MF, 2018. Optimization of Diesel Biodegradation by *Vibrio Alginolyticus* Using Box-Behnken Design. *Environmental Engineering Research*. 23, 374–82. <https://doi.org/10.4491/eer.2018.015>.
24. Iraj, S, Ayatollahi S, 2019. Experimental Investigation on Asphaltene Biodegradability Using Microorganism: Cell Surface Properties' Approach. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*. 9, 1413–22. <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0537-1>.
25. Jadhav S, Sharma S, Sibi G, 2019. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons and Factors Influencing the Degradation Process. *Bioprocess Engineering*. 3, 6. <https://doi.org/10.11648/j.be.20190302.12>.
26. Ji Y, Mao G, Wang Y, Bartlam M, 2013. Structural Insights into Diversity and N-Alkane Biodegradation Mechanisms of Alkane Hydroxylases. *Frontiers in Microbiology*. 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058>.
27. Kinsara RA., Demirbas A, 2016. Upgrading of Crude Oil via Distillation Processes. *Petroleum Science and Technology*. 34, 1300–1306. <https://doi.org/10.1080/10916466.2016.1200080>.
28. Kutanovas, S. 2013. Tetrametilpirazino skaidymo *Rhodococcus* sp. TMP1 bakterijose tyrimas [disertacijos darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2018.
29. Ladino-Orjuela G, Gomes E, Silva R, et al., 2016. Metabolic Pathways for Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Edited by W.P. de Voogt, 237, 105–21. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23573-8_5).
30. Lee M, Srinivasan S, Kim MK, 2010. New Taxa in Alphaproteobacteria: *Brevundimonas Olei* Sp. Nov., an Esterase-Producing Bacterium. *The Journal of Microbiology*. 48, 616–22. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-9367-7>.
31. Li X, Zhao Q, Wang X, et al., 2018. Surfactants Selectively Reallocated the Bacterial Distribution in Soil Bioelectrochemical Remediation of Petroleum Hydrocarbons.

- Journal of Hazardous Materials.* 344, 23–32.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.050>.
32. Li X, Li H, Qu C, 2019. A Review of the Mechanism of Microbial Degradation of Petroleum Pollution. *Materials Science and Engineering.* 484.  
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/484/1/012060>.
  33. Matukaitytė I. Plonasluoksnės chromatografijos metodikos optimizavimas antidepresantų mišinio skirstymui ir identifikavimui [magistrinis darbas]. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas; 2013.
  34. Mbadinga SM, WangLY, Zhou L, et al., 2011. Microbial Communities Involved in Anaerobic Degradation of Alkanes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.009>.
  35. Narmandakh A, Gad'on N, Drepper F, et al., 2006. Phosphorylation of Phenol by Phenylphosphate Synthase: Role of Histidine Phosphate in Catalysis. *Journal of Bacteriology* 188, 7815–22. <https://doi.org/10.1128/JB.00785-06>.
  36. Parthipan P, Elumalai P, Sathishkumar K, et al., 2017. Biosurfactant and Enzyme Mediated Crude Oil Degradation by Pseudomonas Stutzeri NA3 and Acinetobacter Baumannii MN3. *Biotech.* 7, 278. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0902-7>.
  37. Parthipan P, Preetham E, Laura L. et al., 2017. Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium Bacillus Subtilis A1. *Frontiers in Microbiology.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193>.
  38. Roy A. 2018. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and Its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications.* 8. <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000248>.
  39. Sabra W, Zeng AP, 2014. Mixed Microbial Cultures for Industrial Biotechnology: Success, Chance, and Challenges, 35.
  40. Safinowski M, Meckenstock RU, 2006. Methylation Is the Initial Reaction in Anaerobic Naphthalene Degradation by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture. *Environmental Microbiology.* 8, 347–52. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00900.x>.
  41. Saitou N, Nei M, 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
  42. Santisi S, Cappello S, Catalfamo M, et al., 2015. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium. *Brazilian Journal of Microbiology.* 46, 377–87. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131276>.

43. Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, et al., 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.
44. Sathishkumar M, Binupriya AR, Baik SH et al., 2008. Biodegradation of Crude Oil by Individual Bacterial Strains and a Mixed Bacterial Consortium Isolated from Hydrocarbon Contaminated Areas. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 36, 92–96. <https://doi.org/10.1002/clen.200700042>.
45. Schleifer KH, Geyer U, Kilpper-Bälz R, et al., 1983. Elevation of *Staphylococcus Sciuri* Subsp. *Lentus* (Kloos et al.) to Species Status: *Staphylococcus Lentus* (Kloos et al.) Comb. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 4, 382–87. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(83\)80022-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(83)80022-8).
46. Shah N, Nikam R, Gaikwad S, et al., 2016. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian Journal of Microbiology Research*. 3, 5. <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>.
47. Sharma S, Pandey LM, 2020. Production of Biosurfactant by *Bacillus Subtilis* RSL-2 Isolated from Sludge and Biosurfactant Mediated Degradation of Oil. *Bioresource Technology*. 307, 123261. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123261>.
48. Siles JA, García-Sánchez M, 2018. Microbial Dynamics During the Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils Through Biostimulation: An Overview. In *Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology*. 115–34. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02369-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02369-0_7).
49. Smulek W, Sydow M, Zabielska-Matejuk J, et al., 2020. Bacteria Involved in Biodegradation of Creosote PAH – A Case Study of Long-Term Contaminated Industrial Area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 187, 109843. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109843>.
50. So CM, Phelps CD, Young LY, 2003. Anaerobic Transformation of Alkanes to Fatty Acids by a Sulfate-Reducing Bacterium, Strain Hxd3. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 3892–3900. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3892-3900.2003>.
51. Speight JG, 2014. *The Chemistry and Technology of Petroleum, Fifth Edition*. CRC Press.
52. Sugihara S, 2014. Petroleum Resin. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, edited by Shiro Kobayashi and Klaus Müllen, 1–6. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9\\_240-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9_240-1).

53. Tavassoli TSM, Shojaosadati SA, Salehizadeh H, 2012. Asphaltene Biodegradation Using Microorganisms Isolated from Oil Samples. *Fuel*. 93, 142–48. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.021>.
54. Tripathi V, Gaur VK, Dhiman N, et al., 2019. Characterization and Properties of the Biosurfactant Produced by PAH-Degrading Bacteria Isolated from Contaminated Oily Sludge Environment. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05591-3>.
55. Uzair BMM, Tassadaq S, Khan S, Khan BA, 2016. Bacteria-Mediated Degradation of Petroleum Hydro-Carbon Contaminants: An Overview. *Latin American Applied Research*. 8.
56. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP, 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 503–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>.
57. Varjani SJ, 2017. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons. *Bioresource Technology*. 223, 277–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>.
58. Varjani SJ, Upasani VN, 2017. A New Look on Factors Affecting Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation* 120, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>.
59. Vijayakuma S, Saravanan V, 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. 10, 181–92. <https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192>.
60. Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, et al., 2007. Bacterial Metabolism of Long-Chain n-Alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 1209–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1119-1>.
61. Zhang L, Pan Y, Wang K, et al., 2015. *Pseudomonas Songnenensis* Sp. Nov., Isolated from Saline and Alkaline Soils in Songnen Plain, China. *Antonie van Leeuwenhoek*. 107, 711–21. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0365-3>.
62. Zohuriaan-Mehr MJ, Omidian H, 2000. Petroleum Resins: An Overview. *Journal of Macromolecular Science*. 40, 23–49. <https://doi.org/10.1081/MC-100100577>.