

## DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES OF *NOCARDIA VACCINII* K-8

N. Gritsenko, T. Pirog

National University of Food Technologies

### Key words:

Bacteria of *Nocardia* genus  
Surfactants  
Intensification of biosynthesis  
Waste of biodiesel production

### Article history:

Received 15.01.2013  
Received in revised form  
18.02.2013  
Accepted 20.03.2013

### Corresponding author:

E-mail:  
npnuht@ukr.net

### ABSTRACT

*N. vaccinii* IMB B-7405, which is a producer of exocellular metabolites with surface-active and emulsifying properties, has been selected. It is determined that the chemical composition of exocellular surface-active substances of strain IMB B-7405 is a complex of neutral, amino- and glycolipids. The possibility of an increase of conditional SAS concentration by 40 % after introducing 0.1 % fumarate (precursor of gluconeogenesis) and 0.1 % citrate (regulator of lipid synthesis) into the medium with glycerol in the early stationary growth phase of *N. vaccinii* IMB B-7405 is shown. The maximal oil destruction degree in polluted water (2.6 g/L) and soil (20 g/kg) was 87–98 % and it has been achieved after treatment with *N. vaccinii* IMB B-7405 cells suspension and SAS containing preparations.

## ТЕХНОЛОГІЯ І ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Н.А. Гриценко, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

Селекціоновано *N. vaccinii* IMB B-7405 — продуцент позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями. Вперше встановлено здатність бактерій роду *Nocardia* до синтезу ПАР на етанолі та гліцерині. Показано можливість підвищення на 40 % умовної концентрації ПАР у разі внесення на початку стаціонарної фази росту *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовище з гліцерином 0,1 % фумарату і 0,1 % цитрату. За використання суспензії клітин *N. vaccinii* IMB B-7405 і препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини максимальний ступінь деструкції нафтових забруднень у воді (2,6 г/л) і ґрунті (20 г/кг) становив 87–98 %.

**Ключові слова:** бактерії роду *Nocardia*, поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, відходи виробництва біодизелю.

Останніми роками мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень, що зумовлене їх можливим практичним використанням у різних галузях промисловості, а також у природоохоронних технологіях для очищення довкілля. Перевагами мікробних ПАР порівняно з хімічними аналогами є біодеградабельність, нетоксичність, постійність фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН і температури [1].

Раніше на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій із забруднених нафтою зразків води і ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8 [2]. Цей штам

характеризувався здатністю до асиміляції вуглеводневих субстратів (нафта, рідкі парафіни, гексадекан), причому ступінь утилізації цих гідрофобних сполук підвищувався у разі іммобілізації бактеріальних клітин. Тому метою нашої роботи було розробити шляхи інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* K-8 на різних вуглецевих субстратах та дослідити можливість їх практичного використання.

Основним об'єктом досліджень був штам *Nocardia vaccinii* K-8, депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером IMB B-7405. У роботі використовували чисті культури бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1), дріжджів (*Candida scottii* М-8, *Pichia fabiani* ПБТ-5, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3) і мікроміцетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Penicillium chrysogenum* Ф-7) з колекції живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Об'єктами досліджень також були фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1015, *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) та фітопатогенні бактерії *Pseudomonas corrugate* 9070, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* 7696, *Xanthomonas vesicatoria* 7790 з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штами фітопатогенних бактерій люб'язно надані співробітниками відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Культивування бактерій здійснювали на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/дм<sup>3</sup>): середовище 1:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,8;  $\text{NaOH}$  — 1,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,6;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,4;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001, рН 6,8–7,0. Середовище 2:  $\text{KNO}_3$  — 1,0;  $\text{NaCl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1, рН 6,8 – 7,0. Середовище 3:  $\text{NaNO}_3$  — 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,1; рН 6,8 – 7,0.

У процесі дослідження впливу природи джерела азоту на синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 нітрат натрію у середовищі 3 був замінений еквімолярною за азотом концентрацією  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  та  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ .

Як джерело вуглецю та енергії використовували (%, об'ємна частка): гексадекан — 2, рідкі парафіни (*n*-алкани  $\text{C}_{10}$  —  $\text{C}_{16}$ ) — 2, етанол — 1 – 2, гліцерин — 0,5 – 3,5, а також глюкозу масовою часткою 1 – 2 %. У деяких варіантах *N. vaccinii* IMB B-7405 культивували на середовищах 2 і 3, в які додатково вносили (окремо і разом) дріжджовий екстракт — 0,15 – 0,3 г/дм<sup>3</sup>, розчин мікроелементів 0,1 % (об'ємна частка) і  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001 г/дм<sup>3</sup>.

Оптимізацію складу поживного середовища здійснювали за схемою повного факторного експерименту (ПФЕ) 2<sup>3</sup>, який включав план по кожному фактору (компоненти середовища:  $\text{NaNO}_3$  — 0,5 – 1,5 г/дм<sup>3</sup>, гліцерин — 0,5 – 3,5 % (об'ємна частка), дріжджовий екстракт — 0,15 – 0,5 г/дм<sup>3</sup>), представленому в мінімальних і максимальних його концентраціях. Отримані результати аналізували відповідно алгоритму Іетса [3].

В одному з варіантів в експоненційній та на початку стаціонарної фази росту *N. vaccinii* IMB B-7405 у середовище з гліцирином (1 %) додатково вносили цитрат та фумарат натрію масовою часткою 0,01 – 0,5 %.

Як посівний матеріал використовували дводобову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту, вирощену на мінеральних середовищах 1 – 3 з 0,5 % етанолу, глюкози та гліцерину. Кількість інокуляту ( $10^4$ – $10^5$  клітин/см<sup>3</sup>) становила 5 – 15 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 см<sup>3</sup> із 100 см<sup>3</sup> середовища на качалці (320 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 96 – 168 год.

Показники росту і синтезу ПАР (біомаса, умовна концентрація ПАР — ПАР\*, індекс емульгування  $E_{24}$ , вихід від субстрату, кількість синтезованих позаклітинних ПАР), а також якісний аналіз поверхнево-активних ліпідів визначали як було описано в праці [3].

Біодеградабельність поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB B-7405, а також можливість біодеструкції ПАР цього штаму мікрофлорою повітря встановлювали так, як описано у попередніх роботах [4].

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю клітин і препаратів ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснювали на модельній водоймі (2 дм<sup>3</sup> бюветної води). На поверхню води наносили нафту (2,6 г/дм<sup>3</sup>), після чого додавали суспензію клітин ( $9,8 \cdot 10^7$  КУО/см<sup>3</sup> і  $4,9 \cdot 10^7$  КУО/см<sup>3</sup>) або препарати ПАР (постферментаційна культуральна рідина чи супернатант у концентрації 5 і 15 % від об'єму води). Як джерело біогенних елементів використовували діамонійфосфат (0,01 %). Загальну кількість живих клітин у бюветній воді упродовж експерименту (30 діб) визначали за методом Коха на МПА.

Моделювання забрудненого нафтою піску здійснювали так. Досліджувані проби (1 кг стерильного піску) забруднювали 20 см<sup>3</sup> нафти, після чого вносили 300 см<sup>3</sup> препарату ПАР (постферментаційна культуральна рідина чи супернатант) і 0,01 % діамонійфосфату. Проби періодично перемішували для покращення аерації та зволожували стерильною водою.

Моделювання забрудненого нафтою ґрунту — у пластикову ємність вносили 1 кг ґрунту, 20 см<sup>3</sup> нафти, препарати ПАР (100 – 300 см<sup>3</sup>) у вигляді постферментаційної культуральної рідини чи супернатанту і 0,01 % діамонійфосфату. Проби кожні три дні перемішували для покращення аерації та зволожували стерильною водою. Час експозиції 30 діб.

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин визначали так. Із супернатанту культуральної рідини, що містить ПАР (препарат 1), екстрагуванням сумішшю Фолча виділяли ПАР (препарат 2). Водна фаза, що залишилася після екстракції, умовно названа препарат 3. Концентрацію ПАР в препаратах 1 і 2 встановлювали ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча.

У вихідній суспензії тест-культур фітопатогенних бактерій вирощених на середовищі Громико (сусло і МПА, 1:1) при 30 °С, визначали кількість живих клітин за методом Коха. Потім суспензію тест-культур вносили у пробірки (1,5 см<sup>3</sup>), додавали по 1,5 см<sup>3</sup> препарату ПАР (препарати 1 – 3), витримували упродовж 1 і 2 год при температурі, оптимальній для їх росту, після чого встановлювали кількість живих клітин за методом Коха. Вживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у оброблених препаратами ПАР зразках до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Відомо, що більшість мікробних ПАР синтезуються за умов росту продуцентів на гідрофобних субстратах. У попередніх дослідженнях нами було встановлено здатність *Nocardia* IMB B-7405 синтезувати ПАР за використання як гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни), так і гідрофільних субстратів (етанол, глюкоза) [5]. Разом з тим у доступній нам літературі не вдалося знайти відомостей про здатність представників роду *Nocardia* синтезувати ПАР на гліцерині. Більш того, дані про синтез ПАР нокардіями доволі обмежені. Відомо про штам *Nocardia* sp. L-417, що здатний синтезувати ПАР на гідрофобних субстратах [6].

Водночас використання гліцерину як ростового субстрату є одним із способів підвищення ефективності технологій мікробних ПАР, промислове виробництво яких не реалізовано через високу собівартість [7]. Тому у своїх дослідженнях штам IMB B-7405 вирощували на середовищі з гліцерином, що є побічним продуктом технології виробництва біодизелю з рослинної і тваринної сировини і потребує утилізації. Дослідження показали, що максимальні значення ПАР\* (до 4,2) на середовищі 3 з гліцерином (0,5 %) спостерігалися за внесення дріжджового екстракту і сульфату заліза, використання посівного матеріалу, вирощеного на гліцерині, тривалості культивування 168 год.

Важливим фактором, що впливає на ефективність технологій мікробного синтезу, у тому числі й мікробних ПАР, є природа і концентрація джерела азотного живлення, а також якість інокуляту [1]. Встановлено, що найвищі показники синтезу поверхнево-активних речовин у процесі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на гліцерині спостерігалися за умови використання нітрату натрію як джерела азотного живлення і 10 % посівного матеріалу, вирощеного до середини експоненційної фази росту на середовищі з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину, 0,5 г/дм<sup>3</sup> NaNO<sub>3</sub>, 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового екстракту і 0,001 г/дм<sup>3</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

Визначення хімічного складу позаклітинних ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 показало, що у встановлених оптимальних умовах штам синтезує комплекс нейтральних, гліко- та аміноліпідів, серед яких ідентифіковано позаклітинні трегалозодиміколиати.

Тому виходячи з хімічної природи ПАР, ми припустили, що можна підвищити показники їх біосинтезу внесенням у середовище з гліцерином цитрату натрію (регулятор синтезу ліпідів) і  $C_4$ -дикарбонових кислот (попередники глюконеогенезу). Дослідження показали, що оптимальна концентрація фумарату і цитрату становить 0,1 %, а підвищення синтезу ПАР спостерігали лише у разі внесення органічних кислот на початку стаціонарної фази росту продуцента. У ході подальших досліджень було встановлено, що за одночасного внесення на початку стаціонарної фази росту 0,1 % цитрату і 0,1 % фумарату кількість синтезованих ПАР підвищувалася на 41 % (табл. 1).

**Таблиця 1. Вплив фумарату і цитрату на синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на гліцерині**

| Концентрація органічних кислот, % | ПАР*, % від контролю | Концентрація ПАР, % від контролю |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Без попередників                  | 100                  | 100                              |
| цитрат 0,1 + фумарат 0,1          | 125 ± 0,5            | 141 ± 0,3                        |
| цитрат 0,1 + фумарат 0,2          | 125 ± 0,4            | 140 ± 0,4                        |
| цитрат 0,2 + фумарат 0,2          | 115 ± 0,4            | 125 ± 0,3                        |

З літератури відомо, що застосування методів математичного планування є ефективним способом підвищення синтезу цільового продукту. Нами було встановлено значимі для росту і синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 компоненти поживного середовища: джерело вуглецю та енергії (гліцерин), джерело азоту ( $NaNO_3$ ) та дріжджовий екстракт. Тому надалі за допомогою повного факторного експерименту (ПФЕ 2<sup>3</sup>) встановлювали їх оптимальні концентрації як було описано раніше [3].

Використання математичних методів планування експерименту дало змогу збільшити умовну концентрацію ПАР на 24 % (з 4,2 до 5,2) порівняно з результатами однофакторних досліджень. Визначення концентрації ПАР ваговим методом показало, що після оптимізації складу середовища синтез ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 підвищився у 4 рази (до 12,6 г/см<sup>3</sup>) порівняно з показниками до оптимізації.

Дослідженням можливого практичного використання ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 передувало вивчення їх біодеградабельності. Експерименти показали, що штам ІМВ В-7405 не використовує власні ПАР як джерело вуглецевого живлення, що є вагомою перевагою для подальшого використання препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини. У ході подальших досліджень встановлено, що мікроорганізми різних таксономічних груп асимілювали ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, що підтверджувалося активним ростом культур на цьому субстраті та зниженням умовної концентрації ПАР на 14 добу культивування. У зв'язку із встановленим фактом біодеградації ПАР штаму ІМВ В-7405 постало завдання підбору біоцидів для їхнього захисту від руйнування сторонніми мікроорганізмами. Показано, що використання 0,5 % формаліну як біоциду дає змогу подовжити до 30 діб термін зберігання ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 без істотної втрати їх поверхнево-активних властивостей.

На наступному етапі досліджували можливість очищення забрудненої нафтою (2,6 г/дм<sup>3</sup>) води за присутності клітин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (табл. 2).

Результати показали, що ефективність очищення води після одноразової обробки суспензією клітин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (9,8·10<sup>7</sup> КУО/см<sup>3</sup>, 30 діб) становила 95 %.

Дослідження можливості очищення забрудненого нафтою ґрунту показало, що за присутності 300 см<sup>3</sup> препарату ПАР у вигляді культуральної рідини ступінь деструкції нафти був найвищим і досягав 85 % через 30 діб.

Таблиця 2. Вплив концентрації клітин *N. vaccinii* IMB B-7405 на ступінь деструкції нафти у воді

| Концентрація клітин у суспензії, КУО/см <sup>3</sup> | Кількість процедур обробки | Залишкова концент-<br>рація нафти, г/дм <sup>3</sup> | Ступінь деградації нафти, % |
|------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------|
| (9,8±0,5) · 10 <sup>7</sup>                          | Одна                       | 0,14±0,007                                           | 95±4,7                      |
|                                                      | Дві                        | 0,45±0,023                                           | 83±4,2                      |
| (4,9±0,2) · 10 <sup>7</sup>                          | Одна                       | 0,56±0,028                                           | 79±4,0                      |
|                                                      | Дві                        | 0,78±0,14                                            | 70±3,5                      |

Подальші експерименти показали, що за присутності ПАР штаму IMB B-7405 у вигляді культуральної рідини (30 см<sup>3</sup>) ступінь відмивання піску від нафти (0,1 см<sup>3</sup> нафти/1 г піску) становив 90 %.

Одержані результати підтверджують перспективність використання ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 у природоохоронних технологіях для очищення довкілля від нафтових забруднень.

Оскільки актуальною проблемою сьогодення є боротьба з бактеріозами сільсько-господарських культур, на наступному етапі досліджували антимікробну дію ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на фітопатогенні бактерії родів *Pseudomonas* і *Xanthomonas*.

Результати показали, що антимікробні властивості притаманні як препаратам очищених ПАР, так і ПАР у вигляді супернатанту культуральної рідини, а також неідентифікованим на теперішній час позаклітинним метаболітам, що містяться у водній фазі після екстракції ПАР. Так, після обробки упродовж 1 – 2 год досліджуваними препаратами *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,085 – 0,85 мг/см<sup>3</sup>) виживання клітин (10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> в см<sup>3</sup>) переважної більшості фітопатогенних бактерій не перевищувало 0 – 5 %. Одержані результати є перспективними для розробки екологічно безпечних біопрепаратів для контролю чисельності фітопатогенних бактерій.

## Висновки

Розроблено технологію синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, яка порівняно з відомими у світі на основі гліцерину має такі переваги: по-перше, вища концентрація синтезованих позаклітинних ПАР; по-друге, вищий вихід ПАР від заданого субстрату (штам K-8 синтезує 12,6 г/дм<sup>3</sup> ПАР з 1,5 % гліцерину, у той час як інші продуценти від 3 до 8 г/дм<sup>3</sup> ПАР з 2 – 10 % субстрату). Визначено можливість практичного використання ПАР штаму IMB B-7405 у природоохоронних технологіях та як антимікробних агентів.

## Література:

1. Singh A. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects / A. Singh, J.D. Van Hamme, O.P. Ward // Biotechnol. Adv. — 2007. — V. 25. — P. 99 – 121.
2. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, И.Н. Волошина [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — 41, № 1. — С. 58 – 63.
3. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля / Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко, Д.И. Хом'як [та ін.] // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4 — С. 15 – 24.
4. Дослідження біодеградабельності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 / Пирог Т.П., Антонюк С.І., Сорокіна А.І. [та ін.] // Наукові праці НУХТ. — 2009. — № 28. — С. 16 – 18.
5. Пирог Т.П. Штам бактерій *Nocardia vaccinii* K-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин / Тетяна Пирог, Наталія Манжула // Харчова промисловість. — 2008. — № 7. — С. 29 – 32.
6. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417 // H.K. Soon, J.L. Ee, O.L. Sang [et al.] / Biotechnol. Appl. Biochem. — 2000. — V. 31. — P. 249 – 253.

7. *Microbial biosurfactants production, applications and future potential* / Banat I., Franzetti A., Gandolfi I. [et al] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2010. — V. 87, № 2. — P. 427 – 444.

## **РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405**

Н.А. Гриценко, Т.П. Пирог

*Национальный университет пищевых технологий*

Селекционирован *N. vaccinii* IMB B-7405 — продуцент внеклеточных метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами. Экспериментально установлена возможность повышения на 40 % условной концентрации ПАВ в случае внесения в начале стационарной фазы роста *N. vaccinii* IMB B-7405 на среде с глицерином 0,1 % фумарата и 0,1 % цитрата. С помощью математических методов планирования эксперимента оптимизирована питательная среда для культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 и показана способность увеличения в 4 раза (до 12,6 г/дм<sup>3</sup>) концентрации синтезированных штаммом на глицерине ПАВ по сравнению с показателями до оптимизации. Показана возможность использования суспензии клеток *N. vaccinii* IMB B-7405 и препаратов ПАР в виде постферментационной культуральной жидкости для эффективной (до 98 %) деструкции нефтяных загрязнений в воде (2,6 г/дм<sup>3</sup>) и почве (20 г/кг).

**Ключевые слова:** бактерии рода *Nocardia*, поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, отходы производства биодизеля.