

УДК 759.873.088.5:661.185

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Н.А. Гриценко, аспірант

О.О. Боровик, магістрант

А. Д. Конон, аспірант

Національний університет харчових технологій

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОДЕГРАДАБЕЛЬНОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* K-8

*Встановлено здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати поверхнево-активні речовини (ПАР) *Nocardia vaccinii* K-8 як єдине джерело вуглецю та енергії. Показано, що *N. vaccinii* K-8 не здатен використовувати власні ПАР як джерело вуглецевого живлення. Використання як біоциду формаліну у концентрації 0,5 % дає змогу подовжити до 3 місяців термін зберігання ПАР *N. vaccinii* K-8 без суттєвої втрати їх поверхнево-активних властивостей.*

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* K-8, поверхнево-активні речовини, біодеградабельність, формалін, термін зберігання

Серед продуктів мікробного синтезу, широко використовуваних у різних галузях промисловості і природоохоронних технологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків, що особливо актуально на фоні сучасної екологічної кризи, є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР).

Практичне значення мікробних ПАР зумовлене їх здатністю

© Т.П. Пирог, Н.А. Гриценко, О.О. Боровик, А.Д. Конон, 2010

суттєво знижувати поверхневий і міжфазний натяг, а також емульгувальними властивостями. Разом з тим біологічна деструкція ПАР може бути суттєвою перешкодою для їх ефективного практичного використання.

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту ізольовано штам бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і встановлено можливість синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов росту цього штаму на гідрофільних (глюкоза, етанол, гліцерин) і гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) субстратах [1] Основні дослідження були спрямовані на пошук шляхів інтенсифікації синтезу ПАР під час культивування *N. vaccinii* К-8 на гліцерині [2]. Це зумовлене тим, що на теперішній час у світі досить гостро стоїть проблема утилізації гліцерину – побічного продукту, утворюваного у величезних кількостях під час виробництва біодизелю з рослинної і тваринної сировини [3]. Найперспективнішим шляхом вирішення цієї проблеми вважається використання гліцерину як ростового субстрату у біотехнологічних виробництвах практично цінних продуктів.

Мета даної роботи – дослідити біодеградабельність ПАР, синтезованих за умов росту *N. vaccinii* К-8 на гліцерині, та підібрати біоциди для попередження цього процесу.

Як основний об'єкт досліджень використовували штам *Nocardia vaccinii* К-8, а також штами *Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Candida scottii* М-8, *Pichia fabiani* ПБТ-5, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3, *Aspergillus niger* Р-3, *Penicillium chrysogenum* Ф-7. Чисті культури бактерій, грибів та дріжджів зберігаються в музеї живих культур кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Як препарати ПАР використовували постферментаційну культуральну рідину, одержану після культивування *N. vaccinii* К-8 на гліцерині, а також супернатант культуральної рідини.

Культивування *N. vaccinii* К-8 проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин –1,5% (об'ємна частка). У середовище вносили також дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (60 год культивування), вирощену на середовищі з 0,5 % гліцерину (об'ємна частка), в яке додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001г/л. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 168 год.

Для одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували упродовж 30 хв (5000 g), надосадову рідину зливали і витримували на киплячій водяній бані 30 хв. Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1) поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини, який вимірювали за допомогою напівавтоматичного тензіометра «Lauda TD 1C» (Німеччина) з платиновою пластинкою;

2) для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення вільної від клітин культуральної рідини у точці підвищення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається в умовних одиницях;

Для дослідження здатності *N. vaccinii* К-8 використовувати власні ПАР як джерело вуглецевого живлення культуральну рідину, одержану після культивування штаму в описаних вище умовах, розділили на дві частини. Першу частину культуральної рідини повернули на качалку для подальшого вирощування упродовж ще 7 діб (загальна тривалість культивування штаму К-8 у цьому разі становила 14 діб). Другу частину культуральної рідини використовували для одержання супернатанту (див. вище). У супернатант вносили добову культуру *N. vaccinii* К-8, вирощену на МПА, після чого здійснювали культивування на качалці упродовж 7 діб. У процесі вирощування штаму К-8 кожні 2–4 доби відбирали проби культуральної рідини, в яких визначали загальну кількість живих клітин (за методом Коха на м'ясо-пептонному агарі – МПА).

Для проведення досліджень здатності мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати ПАР *N. vaccinii* К-8 як єдине джерело вуглецю та енергії використовували штами бактерій (*B. subtilis* БТ-2, *E. coli* ІЕМ-1), дріжджів (*C. scottii* М-8, *P. fabiani* ПБТ-5, *S. cerevisiae* ОБ-3), мікроміцетів (*A. niger* Р-3, *P. chrysogenum* Ф-7). Мікроорганізми вирощували на супернатанті культуральної рідини *N. vaccinii* К-8. Як посівний матеріал використовували культури вказаних мікроорганізмів, вирощених на агаризованих середовищах (дріжджі, мікроміцети на глюкозо-картопляному агарі – ГКА, бактерії на МПА). Здатність бактерій, грибів та дріжджів асимілювати ПАР *N. vaccinii* К-8 як єдине джерело вуглецю та енергії оцінювали за кількістю живих клітин упродовж культивування.

Для проведення досліджень біодеструкції ПАР *N. vaccinii* К-8 мікрофлорою повітря використовували супернатант культуральної рідини, що зберігався за різних умов: при додаванні біоциду формаліну (0,1; 0,3 і 0,5 %, об'ємна частка); без біоциду при різних температурних режимах (5 і 25 °С). Як контроль використовували стерильний

супернатант, що зберігався в асептичних умовах. Ступінь біодеструкції оцінювали за зміною показника ПАР у процесі зберігання зразків упродовж 30 діб.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакінім [4]. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно з t -критерієм Стьюдента при 5%-му рівні значимості.

Відомо, що синтезовані деякими видами мікроорганізмів метаболіти можуть асимілюватися самими продуцентами як джерело вуглецевого живлення [5]. Наші експерименти показали, що *N. vaccinii* К-8 не використовує власні ПАР як єдине джерело вуглецю і енергії (табл. 1). Так, у процесі культивування *N. vaccinii* К-8 упродовж 14 діб, а також під час вирощування штаму К-8 на супернатанті культуральної рідини не спостерігали зниження показника ПАР*, який залишався на рівні 2,8. У той же час фіксували зниження на 1–2 порядки кількості живих клітин *N. vaccinii* вже на четверту добу культивування (табл. 1), що може свідчити про перебування штаму К-8 в умовах голодування. Наші попередні дослідження показали, що інші продуценти ПАР (*Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4) також не асимілюють власні поверхнево-активні речовини як джерело вуглецевого живлення [6]. Стійкість досліджуваних поверхнево-активних речовин за присутності клітин продуцента є важливою умовою і вагомою перевагою для подальшого практичного використання препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини, наприклад, для очищення довкілля від нафтових забруднень.

Подальші дослідження показали, що мікроорганізмам різних таксономічних груп притаманна здатність асимілювати ПАР *N. vaccinii* К-8 як єдине джерело вуглецю і енергії, що підтверджується активним ростом культур на цьому субстраті (табл. 1). Зважаючи на те, що залишкового гліцерину у постферментаційній культуральній рідині *N. vaccinii* К-8 не було виявлено, а клітини продуцента (які могли б містити

потенційні джерела вуглецевого живлення для росту тест-культур) відділили у процесі центрифугування, можна зробити висновок, що тест-культури використовували ПАР *N. vaccinii* К-8 як єдине джерело вуглецю та енергії.

У зв'язку з встановленим фактом біодеградації ПАР *N. vaccinii* К-8 перед нами постала задача підбору біоцидів для їх захисту від руйнування сторонніми мікроорганізмами.

Таблиця 1

Здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* К-8

Досліджені мікроорганізми	Ріст мікроорганізмів (КУО/мл) при культивуванні упродовж (діб)		
	0	4	7
Мікроміцети <i>Aspergillus niger</i> Р-3 <i>Penicillium chrysogenum</i> Ф-7	$(5,93 \pm 0,29) \cdot 10^6$ $(2,20 \pm 0,11) \cdot 10^6$	$(6,63 \pm 0,33) \cdot 10^9$ $(3,45 \pm 0,17) \cdot 10^9$	$(6,60 \pm 0,33) \cdot 10^6$ $(8,85 \pm 0,44) \cdot 10^6$
Дріжджі <i>Pichia fabiani</i> ПБТ-5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ОБ-3 <i>Candida scottii</i> М-8	$(1,41 \pm 0,07) \cdot 10^6$ $(1,04 \pm 0,05) \cdot 10^6$	$(7,08 \pm 0,35) \cdot 10^9$ $(7,65 \pm 0,38) \cdot 10^9$	$(3,85 \pm 0,19) \cdot 10^7$ $(2,50 \pm 0,12) \cdot 10^6$
Бактерії <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 <i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	$(1,28 \pm 0,06) \cdot 10^6$ $(5,50 \pm 0,27) \cdot 10^4$	$(5,75 \pm 0,28) \cdot 10^8$ $(2,50 \pm 0,12) \cdot 10^7$	$(1,78 \pm 0,8) \cdot 10^6$ $(5,00 \pm 0,02) \cdot 10^4$
Продуцент <i>N. vaccinii</i> К-8	$(7,28 \pm 0,36) \cdot 10^5$	$(4,67 \pm 0,23) \cdot 10^4$	$(9,50 \pm 0,47) \cdot 10^3$

Примітка. У табл. 1 і табл. 2 умовна концентрація поверхнево-активних речовин у препаратах ПАР *N. vaccinii* К-8 (суперанатант культуральної рідини) становила 2,8.

З літератури і власних попередніх експериментальних досліджень відомо, що одним з найбільш ефективних біоцидів, які попереджають біодеструкцію речовин мікробного походження, у тому числі й поверхнево-активних речовин є формальдегід [5, 6].

У подальших експериментах досліджували здатність до біодеструкції ПАР *N. vaccinii* К-8 мікрофлорою повітря та можливість використання формаліну для пригнічення розвитку сторонньої мікрофлори. Встановлено, що при зберіганні стерильного супернатанту культуральної рідини в асептичних умовах упродовж 30 діб показник умовної концентрації ПАР зразків не змінювався (табл. 2) і становив 2,8.

Внесення формаліну у концентрації 0,5 % (об'ємна частка) дало змогу мінімізувати ступінь деструкції ПАР у супернатанті під час зберігання. Не оброблені біоцидами зразки культуральної рідини, що зберігалися у неасептичних умовах приблизно на 15 добу інфікувалися мікроміцетами та бактеріями. При цьому на 20 добу спостерігалася зміна

Таблиця 2

Вплив формаліну на біологічну деструкцію ПАР *N. vaccinii* К-8 мікрофлорою повітря

Біоцид	Концентрація, %	ПАР*		
		Тривалість зберігання, діб		
		7	14	30
Формалін	0,1	2,6±0,13	2,2±0,05	2,0±0,01
	0,3	2,7±0,11	2,4±0,02	2,3±0,04
	0,5	2,7±0,11	2,6±0,01	2,5±0,05
Без формаліну в умовах: асептичних нестерильних нестерильних, при зниженій температурі	0	2,8±0,14	2,8±0,14	2,8±0,14
	0	2,1±0,10	1,6±0,08	1,25±0,06
	0	2,4±0,02	1,8±0,09	1,4±0,07

забарвлення культуральної рідини (з прозорого з жовтим відтінком до насичено-жовтого або темно-жовтого з помітним помутнінням).

У наших попередніх дослідженнях [6] було показано, що попередження біодеструкції поверхнево-активних речовин *R. erythropolis*

і *A. calcoaceticus* K-4 забезпечується у разі використання формаліну у концентрації 0,1–0,3 %. Як свідчать результати даної роботи, подовжити термін зберігання препаратів ПАР *N. vaccinii* K-8 можна за присутності вищих (0,5 %) концентрацій формаліну.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено можливість біодеструкції поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* K-8 чистими культурами мікроорганізмів (бактерій, грибів і дріжджів), а також мікрофлорою повітря. Обробка препаратів ПАР формаліном у концентрації 0,5 % дає змогу подовжити термін їх зберігання. *N. vaccinii* K-8 не здатний асимілювати власні ПАР як єдине джерело вуглецю і енергії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Штам бактерій *Nocardia vaccinii* K-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин // Харчова промисловість, 2008, № 7, С. 29-32.
2. Пирог Т.П., Манжула Н.А. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccinii* K-8 на гліцерині // Наукові праці НУХТ, 2008, № 25, Ч. I., С. 107-109.
3. Paulo G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // Biotechnol. Advanc. – 2009. – V. 27. – P. 30–39.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. К.: Наук. думка, 1992. – 212 с.
6. Пирог Т.П., Антонюк С.І., Сорокіна А.І., Щербина О. Дослідження біодеградабельності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Наукові праці НУХТ. – 2009. – № 28. – С. 16–18.

Установлена способность микроорганизмов различных таксономических групп ассимилировать поверхностно-активные вещества (ПАВ) *Nocardia vaccinii* K-8 в качестве единственного источника углерода и энергии. Показано, что *N. vaccinii* K-8 не использует собственные ПАВ в качестве источника углеродного питания. Использование формалина в концентрации 0,5 % позволяет увеличить до 3 месяцев срок хранения ПАВ *N. vaccinii* K-8 без существенной потери их поверхностно-активных свойств.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* K-8, поверхностно-активные вещества, биодegradабельность, формалин, срок хранения

The ability of the different taxonomic groups microorganisms to assimilate the surface active substances (SAS) Nocardia vaccinii K-8 as the sole source of carbon and energy was shown. Strain N. vaccinii K-8 can not use proper SAS as the sole of carbon nutrition. The using of 0,5 % formaline as biocide allow to prolong the storage time of the SAS N. vaccinii K-8 without the loss of surface active properties.

Key words: *Nocardia vaccinii* K-8, surface active substances, biodestruction, formalin, period of storage

Одержана редколегією 13.12.10 р.