

Т.П. Пирог^{1,2}, Антонюк С.І.¹, Сорокіна А.І.¹

¹Національний університет харчових технологій,

вул. Володимирська, 68, Київ, 01033, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

БІОДЕГРАДАЦІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ШТАМУ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4*

Встановлено здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати поверхнево-активні речовини (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus K-4 як єдине джерело вуглецю та енергії. Показано, що A. calcoaceticus K-4 не здатен використовувати власні ПАР як джерело вуглецевого живлення. Використання як біоциду формаліну у концентрації 0,1 % дає змогу подовжити до 3,5 місяців термін зберігання ПАР A. calcoaceticus K-4 без втрати їх поверхнево-активних та емульгувальних властивостей.

К л ю ч о в і с л о в а: Acinetobacter calcoaceticus K-4, поверхнево-активні речовини, біодеструкція, біоциди

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям є об'єктом як теоретичних, так і прикладних досліджень. Практичне значення мікробних ПАР зумовлено їх здатністю суттєво знижувати поверхневий і міжфазний натяг, а також емульгувальними властивостями. Не дивлячись на те, що мікробні ПАР є відносно новим продуктом сучасної біотехнології, вони знаходять використання для очищення

довкілля, у нафтодобувній, хімічній, фармацевтичній промисловостях, сільському господарстві та медицині [7, 8]. Відомо, що мікробні ПАР за своїми властивостями не поступаються синтетичним аналогам, а такі їх переваги як біодеградабельність і нетоксичність роблять їх перспективними для створення екологічно безпечних технологій. Разом з тим біологічна деструкція ПАР може бути суттєвою перешкодою для їх ефективного практичного використання.

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту нами було ізольовано штам бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4. Встановлено умови культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі, що забезпечують підвищення у три рази показників синтезу поверхнево-активних речовин [1, 6].

Мета даної роботи – дослідити біодеградабельність ПАР *A. calcoaceticus* К-4 та підібрати біоциди для попередження цього процесу.

М а т е р і а л и і м е т о д и

Як основний об'єкт досліджень використовували ізольований із забруднених нафтою зразків ґрунту штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, депонований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером ІМВ В-7241.

У роботі також використовували чисті культури бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1), дріжджів (*Pichia pinus* ПБТ-5, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3, *Candida scottii* М-8), мікроміцетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Penicillium chrysogenum* Ф-7) з музею живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Як препарати ПАР використовували постферментаційну культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі, а також супернатант культуральної рідини.

Штам *A. calcoaceticus* K-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,3; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, pH 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка) [4]. Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з кінця експоненційної фази росту (72 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 2 % етанолу. Кількість інокуляту – 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 5 діб.

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 платинової і скляної пластинки за методом Вільгельмі;

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 зниження поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається в умовних одиницях;

3) індекс емульгування (E_{24} , %) культуральної рідини, який визначали за методом, описаним у праці [6]. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Для дослідження здатності *A. calcoaceticus* K-4 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 14 діб (загальна тривалість культивування штаму К-4 у цьому разі становила 19 діб). Другу частину культуральної рідини використовували для одержання супернатанту (див. вище). У супернатант вносили добову культуру *A. calcoaceticus* К-4, вирощену на МПА, після чого здійснювали культивування на качалці упродовж 14 діб. У процесі вирощування штаму К-4 кожні 2–4 доби відбирали проби культуральної рідини, в яких аналізували рівень біомаси (за оптичною густиною клітинної суспензії), загальну кількість живих клітин (за методом Коха на м'ясо-пептонному агарі – МПА), показники ПАР* і E_{24} .

Для проведення досліджень здатності мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати ПАР *A. calcoaceticus* К-4 як єдине джерело вуглецю та енергії використовували штами бактерій (*B. subtilis* БТ-2, *E. coli* ІЕМ-1), дріжджів (*P. pinus* ПБТ-5, *S. cerevisiae* ОБ-3, *C. scottii* М-8), мікроміцетів (*A. niger* Р-3, *P. chrysogenum* Ф-7). Мікроорганізми вирощували на супернатанті культуральної рідини *A. calcoaceticus* К-4. 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 *A. calcoaceticus* К-4 як єдине джерело вуглецю та енергії оцінювали за такими показниками: кількість живих клітин та умовна концентрація ПАР.

Для вивчення здатності досліджуваних мікроорганізмів синтезувати ПАР їх вирощували на рідкому середовищі Мюнца [5] з етанолом (2 %, об'ємна частка) як джерелом вуглецю і енергії. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 7 діб. Як посівний матеріал використовували добові культури мікроорганізмів, вирощені на ГКА і МПА.

Для проведення досліджень біодеструкції ПАР *A. calcoaceticus* К-4 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 показників ПАР*, E_{24} і кількості живих клітин у процесі зберігання зразків упродовж 100 діб.

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

Результати та їх обговорення

Відомо, що синтезовані деякими видами мікроорганізмів метаболіти можуть асимілюватися самими продуцентами як джерело вуглецевого живлення [2]. Наші експерименти показали, що *A. calcoaceticus* К-4 не використовує власні ПАР як єдине джерело вуглецю і енергії (табл. 1).

Як видно з даних, наведених у табл. 1, культивування штаму К-4 упродовж 14 діб після досягнення максимальних показників синтезу ПАР (зразок КР) не супроводжувалося зниженням умовної концентрації ПАР та індексу емульгування.

У процесі вирощування штаму К-4 на супернатанті культуральної рідини (зразок СП) також не спостерігали зниження показників ПАР* і E_{24} , які залишалися на рівні 4,1 і 77–80 % відповідно упродовж 14 діб. У той же час в обох зразках (як СП, так і КР) фіксували суттєве (на 2–3 порядки) зниження кількості живих клітин вже на сьому добу культивування *A. calcoaceticus* К-4 (табл. 1), що може свідчити про перебування штаму К-4 в умовах голодування.

Таблиця 1

Здатність *A. calcoaceticus* K-4 асимілювати власні поверхнево-активні речовини як єдине джерело вуглецю та енергії

Тривалість культивування, діб	ПАР*		E ₂₄ , %		ОГ		КУО/мл	
	СП	КР	СП	КР	СП	КР	СП	КР
0	4,1	4	78,2	75,3	1,8	Н.в.	$5,4 \times 10^9$	$3,3 \times 10^6$
3	4,1	4	80,4	68,4	1,9	Н.в.	$2,1 \times 10^9$	$4,2 \times 10^5$
5	4,1	4	79,6	70,1	1,9	Н.в.	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^4$
7	4,1	4	76,8	72,2	1,9	Н.в.	$5,7 \times 10^7$	$6,2 \times 10^3$
10	4,1	4	80,2	69,4	1,9	Н.в.	$4,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^3$
14	4,1	4	77,8	73,5	1,9	Н.в.	$2,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^2$

П р и м і т к и. ОГ – оптична густина, КУО – колонійутворювальні одиниці, СП – супернатант культуральної рідини, КР – культуральна рідина. Н. в. – не визначали. Для одержання зразків СП і КР вирощування штаму K-4 здійснювали упродовж 5 діб.

Стійкість поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* К-4 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, як було показано нами раніше [1].

Подальші дослідження показали, що мікроорганізмам різних таксономічних груп притаманна здатність асимілювати ПАР *A. calcoaceticus* К-4, що підтверджувалося активним ростом культур на цьому субстраті та зниженням ПАР* у досліджуваних зразках на 14 добу культивування (табл. 2).

Слід зауважити, що підвищення умовної концентрації ПАР на 7 добу можна пояснити здатністю мікроорганізмів самостійно синтезувати поверхнево-активні метаболіти (табл. 3).

Раніше нами було показано, що штам *A. calcoaceticus* К-4 синтезує в основному позаклітинні ПАР (1,1–1,2 г/л, що становить 80–85 % від загальної кількості), які є комплексом гліко- і аміноліпідів [6]. Після екстракції сумішшю Фолча ПАР з супернатанту останній втрачав поверхнево-активні властивості, а вміст вуглеводів і білка у ньому не перевищував 50–100 мг/л [6]. Очевидно, що такої концентрації метаболітів, відмінних від ПАР, недостатньо для забезпечення росту мікроорганізмів і досягнення показників, наведених у табл. 2. Отже, саме ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* К-4, є джерелом вуглецю і енергії для досліджуваних бактерій, грибів і дріжджів.

У зв'язку із встановленим фактом біодеградації ПАР *A. calcoaceticus* К-4 мікроорганізмами різних таксономічних груп перед нами постало завдання підбору біоцидів для їхнього захисту від руйнування сторонніми мікроорганізмами. Для цього досліджували здатність до біодеструкції ПАР *A. calcoaceticus* К-4, мікрофлорою повітря за присутності і відсутності біоциду формаліну. Вибір формаліну був зумовлений високою ефективністю його використання для попередження біодеструкції багатьох продуктів мікробного

Таблиця 2

**Здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати
ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 як єдине джерело вуглецю та енергії**

Досліджені мікроорганізми	Початкове значення КУО/мл	7 діб культивування		14 діб культивування	
		ПАР*	КУО/мл	ПАР*	КУО/мл
<i>Aspergillus niger</i> Р-3	$2,1 \times 10^4$	4,8	$6,4 \times 10^8$	1,2	$4,8 \times 10^6$
<i>Penicillium chrysogenum</i> Ф-7	$3,8 \times 10^4$	5,0	$5,3 \times 10^8$	2,6	$4,2 \times 10^5$
<i>Pichia pinus</i> ПБТ-5	$1,7 \times 10^4$	5,2	$2,2 \times 10^8$	0,6	$5,2 \times 10^6$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ОБ-3	$6,3 \times 10^4$	4,5	$3,5 \times 10^8$	2,3	$1,6 \times 10^6$
<i>Candida scottii</i> М-8	$4,9 \times 10^4$	4,9	$1,8 \times 10^7$	1,2	$4,4 \times 10^5$
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	$3,5 \times 10^4$	4,7	$1,2 \times 10^8$	1,2	$3,4 \times 10^5$
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	$5,0 \times 10^4$	4,7	$2,6 \times 10^7$	1,8	$2,7 \times 10^4$

П р и м і т к и. Початкове значення ПАР* культуральної рідини штаму К-4 становило 4,0.

**Синтез поверхнево-активних речовин у процесі вирощування
мікроорганізмів на середовищі з етанолом**

Досліджені мікроорганізми	ПАР*	Ріст мікроорганізмів, КУО/мл
<i>Aspergillus niger</i> Р-3	2,7	$1,1 \times 10^8$
<i>Penicillium chrysogenum</i> Ф-7	1,9	$2,8 \times 10^7$
<i>Pichia pinus</i> ПБТ-5	2,1	$6,5 \times 10^8$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ОБ-3	0,75	$2,1 \times 10^6$
<i>Candida scottii</i> М-8	1,4	$0,9 \times 10^6$
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,6	$8,0 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	0,9	$2,1 \times 10^6$

П р и м і т к и. Початкове значення КУО/мл для мікроорганізмів становило 10^4 – 10^5 .

Таблиця 4

**Вплив формаліну на біодеструкцію поверхнево-активних речовин
штаму *Acinetobacter calcoaceticus* К-4**

Біоцид	Концен-трація, %	ПАР*				Е ₂₄ , %			
		Тривалість зберігання, діб							
		7	45	75	100	7	45	75	100
Формалін	0,1	3,7	3,7	3,7	3,5	78,3	77,6	78,2	76,8
	0,3	3,6	3,6	3,5	3,3	74,7	68,2	66,4	75,6
	0,5	3,5	3,5	3,3	3,0	72,8	74,8	70,6	72,4
Без формаліну в умовах:									
асептичних	0	3,8	3,8	3,8	3,8	79,2	78,4	74,8	76,6
нестерильних	0	3,6	2,7	1,1	Н.в.	60,4	54,4	40,6	Н.в.
нестерильних, при зниженій температурі	0	3,7	3,5	2,4	1,5	68,6	60,6	64,5	9,2

П р и м і т к и. Н.в. – не визначали. Початкове значення ПАР* становило 3,8; індексу емульгування – 79,6 %.

синтезу, у тому числі й поверхнево-активних речовин, як було показано нами раніше для препаратів ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [3].

Експерименти показали, що у процесі зберігання ПАР штаму К-4 упродовж 100 діб в асептичних умовах без добавлення формаліну показники умовної концентрації ПАР та індексу емульгування зразків практично не змінювалися (табл. 4). Зберігання необробленого біоцидом препарату ПАР у нестерильних умовах супроводжувалось суттєвим зниженням на 75 добу показників ПАР* та індексу емульгування. Зниження температури дало змогу подовжити термін зберігання необроблених формаліном зразків (табл. 4). У препаратах, оброблених формаліном (концентрація 0,1; 0,3 та 0,5 %), упродовж 100 діб не спостерігали суттєвого зниження умовної концентрації ПАР та індексу емульгування (табл. 4).

У результаті проведених досліджень встановлено можливість біодеструкції поверхнево-активних речовин штаму *A. calcoaceticus* К-4 чистими культурами мікроорганізмів (бактерій, грибів і дріжджів), а також мікрофлорою повітря. Обробка препаратів ПАР формаліном у концентрації 0,1 % дає змогу подовжити термін їх зберігання. *A. calcoaceticus* К-4 не здатний асимілювати власні ПАР як єдине джерело вуглецю і енергії.

Список літератури

1. Антонюк С.И., Пирог Т.П., Сорокина А.И. Синтез и перспективы практического использования поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Сб. трудов Межд. научн. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 3-6 июня 2008). – С. 251–253.
2. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. К.: Наук. думка, 1992. – 212 с.
3. Ігнатенко С.В., Волошина І.М., Пирог Т.П. Біодеструкція поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 та підбір біоцидів для

попередження цього процесу // Харчова промисловість. – 2007. – № 5. – С. 30–33.

4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

5. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под ред. Д.Г.Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. – 303 с.

6. *Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А.* Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, № 3. – С. 304–310.

7. *Mukherjee S., Das P., Sen R.* Towards commercial production of microbial surfactants // Trends in Biotechnology. – 2006. – Vol. 24, № 11 – P. 354–359.

8. *Ron E.Z., Rosenberg E.* Biosurfactants and oil bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – Vol. 13, № 3. – P. 249–252.