

УДК 759.873.088.5:661.185

С.В. ІГНАТЕНКО

І.М. ВОЛОШИНА

Т.П. ПИРОГ, доктор біологічних наук

Національний університет харчових технологій

**БІОДЕСТРУКЦІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS ЕК-1 ТА ПІДБІР БІОЦИДІВ
ДЛЯ ПОПЕРЕДЖЕННЯ ЦЬОГО ПРОЦЕСУ**

Встановлено можливість біодеструкції поверхнево-активних речовин (ПАР, біосурфактанти), синтезованих Rhodococcus erythropolis ЕК-1, чистими культурами мікроорганізмів та мікрофлорою повітря. Рекомендовано біоциди та підібрані їх концентрації, що дають змогу продовжити термін зберігання ПАР.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis ЕК-1, поверхнево-активні речовини, біодеструкція, біоциди*

Установлена возможность биодеструкции поверхностно-активных веществ (ПАВ, биосурфактанты), синтезированных Rhodococcus erythropolis ЕК-1, чистыми культурами микроорганизмов и микрофлорой воздуха. Рекомендованы биоциды и подобраны их концентрации, которые дают возможность продлить срок хранения ПАВ.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis ЕК-1, поверхностно-активные вещества, биодеструкция, биоциды*

Останнім часом в усьому світі значна увага приділяється усуненню проблем, пов'язаних з порушенням екології, серед яких центральне місце займає забруднення водних ресурсів та ґрунту гідрофобними органічними сполуками (ГОС) – поліциклічними ароматичними вуглеводнями, вуглеводнями нафти, поліхлорованими біфенілами та ін. Нині одним з найперспективніших методів

© С.В. Ігнатенко, І.М. Волошина, Т.П. Пирог, 2006

очистки екосистем від вуглеводнів вважається їх видалення вуглеводоокиснювальними мікроорганізмами при попередній обробці поверхнево-активними речовинами (ПАР, біосурфактанти). Використання ПАР дозволяє суттєво збільшити ступінь десорбції вуглеводнів, підвищити їх біодоступність та тим самим активізувати популяції мікроорганізмів, що населяють забруднені системи. Така схема очистки відрізняється від інших технологій низькими експлуатаційними витратами та високою надійністю, бо зумовлює практично повну деградацію органічних сполук [2, 6].

Впровадження такої технології потребує найменшої деструкції біосурфактантів у процесі їх зберігання, транспортування та використання. Розрізняють хімічну (зокрема окиснювальну), механічну та біологічну деструкції. Найпоширеніший тип деструкції ПАР мікробного походження – руйнування мікроорганізмами, що є перешкодою для ефективного застосування біосурфактантів у процесах очистки різних екосистем від ГОС.

Метою наших досліджень було вивчення біодеградації поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 та підбір ефективних біоцидів для попередження цього процесу.

Штам *R. erythropolis* ЕК-1, ізольований із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує ПАР при рості на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) та гідрофільних (етанол, глюкоза) субстратах [5]. Штам депоновано в Українській колекції мікроорганізмів. Хімічний склад ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 та поверхнево-активні властивості культуральної рідини описані раніше [4, 5].

У зв'язку з тим, що процеси очистки ґрунту від ГОС з економічного погляду не вимагають використання високоочищених поверхнево-активних препаратів, як об'єкт досліджень використовували супернатант культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1, який містить компоненти із емульгувальними та поверхнево-активними властивостями.

Для одержання супернатанту культуральної рідини штам вирощували на рідкому мінеральному середовищі Мюнца у нашій модифікації, г/л: KNO_3 – 1,0; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –

0,001 г/л; рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували гексадекан та етанол в концентрації 2% (за об'ємом). Як посівний матеріал використовували добову культуру *R. erythropolis* ЕК-1, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту (24 год), вирощену на рідкому середовищі з 0,3 % (за об'ємом) гексадекану. В останньому варіанті кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при оптимальній для їх росту температурі 26 °С упродовж 168 год. Для відокремлення клітин бактерій культуральну рідину центрифугували при 9000 об/хв упродовж 50 хв. Одержаний супернатант культуральної рідини стерилізували при температурі 112 °С 30 хв, після чого використовували в подальших експериментах.

При вивченні здатності мікроорганізмів різних таксономічних та фізіологічних груп асимілювати ПАР як єдине джерело вуглецю та енергії використовували чисті культури аеробних бактерій (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Brevibacterium sp.*, *Streptomyces aureofaciens*), дріжджів (*Pichia pinus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida scottii*), мікроміцетів (*Aspergillus niger*, *Penicillium nigricans*) з музею живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології мікробного синтезу. Мікроорганізми вирощували на супернатанті культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1. Як посівний матеріал використовували культури вказаних мікроорганізмів, вирощені на агаризованих середовищах (дріжджі, мікроміцети на глюкозо-картопляному агарі – ГКА, бактерії на м'ясопептонному агарі – МПА).

Здатність бактерій, грибів і дріжджів асимілювати як єдине джерело вуглецю і енергії ПАР *R. erythropolis* ЕК-1, оцінювали за такими показниками: кількість колонієутворювальних одиниць (КУО), яку визначали за методом Коха на МПА та ГКА; вміст ПАР у культуральній рідині (умовна концентрація ПАР, ПАР*) упродовж вирощування мікроорганізмів, який визначали як описано у роботі [5].

Для вивчення здатності досліджуваних бактерій, грибів і дріжджів синтезувати ПАР їх вирощували на рідкому мінеральному середовищі Мюнца з 1 мас. % глюкози як єдиним джерелом вуглецю і енергії. Умови культивування мікроорганізмів і оцінка синтезу ПАР аналогічні описаним вище.

Як біоциди використовували формалін (38 % розчин) та еуксил (Euxyl-K400). Ці сполуки являють собою однорідну рідину без сторонніх домішок світло-жовтого кольору з слабким специфічним запахом. Формалін готують на формальдегідній основі, він не містить фенолів і важких металів. Біоцидна дія формаліну зумовлена денатурацією білків у клітинах мікроорганізмів. Еуксил використовують як бактерицид і фунгіцид широкого спектру дії (бактерії, дріжджі, пліснява), до його складу входять метилдибромглутаронітрил та феноксиетанол. Він ефективний в низьких концентраціях (0,05 – 0,5 %) та при контакті з повітрям, може використовуватися при значеннях рН, вищих за 8.

При вивченні біодеструкції ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 мікрофлорою повітря, використовували супернатант культуральної рідини, що зберігався за різних умов: при додаванні до культуральної рідини біоцидів в різних концентраціях (0,1 – 0,5 % за об'ємом); без біоцидів при різних температурних режимах (при 5 °С та 25 °С). Як контроль використовували стерильний супернатант культуральної рідини, що зберігався в асептичних умовах.

Ступінь біодеструкції ПАР оцінювали за зміною таких показників: вміст ПАР у культуральній рідині упродовж зберігання; індекс емульгування супернатанту культуральної рідини, який визначали за принципом описаним у роботі [5]; кількість колонієутворювальних одиниць у вказаних зразках, яку визначали за методом Коха на МПА та ГКА. Дослідні та контрольні зразки культуральної рідини витримували упродовж чотирьох місяців. Проби для визначення названих показників відбирали кожного тижня упродовж перших двох місяців, далі кожні 15 днів упродовж двох місяців, що залишалися.

Біодеструкція поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 чистими культурами мікроорганізмів. Відомо, що синтезовані деякими видами мікроорганізмів метаболіти (зокрема екзополісахариди) можуть асимілюватися

як самими продуцентами, так і супутньою мікрофлорою як джерело вуглецевого живлення [3]. У зв'язку з цим нами досліджено можливість використання ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 як джерела вуглецю та енергії як самим продуцентом, так і мікроорганізмами різних фізіологічних і таксономічних груп. Встановлено, що *R. erythropolis* ЕК-1 здатен активно використовувати синтезовані біосурфактанти як джерело вуглецевого живлення, про що свідчить суттєве зниження умовної концентрації ПАР в зразках культуральної рідини з 3,8 до 0,8 вже на десяту добу культивування бактерій.

Виявлено, що мікроорганізмам різних фізіологічних і таксономічних груп притаманна здатність асимілювати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1, що підтверджується активним ростом культур на цьому субстраті та зниженням ПАР* в досліджуваних зразках культуральної рідини (табл. 1). Слід зауважити, що недостатньо активне зниження умовної концентрації ПАР при рості деяких мікроорганізмів можна пояснити їхньою здатністю самостійно синтезувати поверхнево-активні метаболіти (табл. 2).

Таблиця 1

Здатність мікроорганізмів різних фізіологічних і таксономічних груп асимілювати поверхнево-активні речовини

***Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 як єдине джерело вуглецю та енергії**

Досліджені мікроорганізми	Ріст мікроорганізмів при культивуванні упродовж, год		ПАР* у процесі культивування упродовж, год	
	10	20	10	20
1	2	3	4	5
Мікроміцети				
<i>Aspergillus niger</i>	$5,4 \cdot 10^{12}$	$6,7 \cdot 10^{12}$	3,4	н.в.
<i>Penicillium nigricans</i>	$1,5 \cdot 10^{11}$	$6,6 \cdot 10^{12}$	4,5	2,8
Дріжджі				
<i>Pichia pinus</i>	$1,0 \cdot 10^{13}$	$3,6 \cdot 10^{13}$	3,3	2,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$3,0 \cdot 10^{12}$	$4,0 \cdot 10^{12}$	4,1	3,6
<i>Candida scottii</i>	$1,7 \cdot 10^{12}$	$3,3 \cdot 10^{12}$	3,4	н.в.

1	2	3	4	5
Бактерії				
<i>Bacillus subtilis</i>	$7,0 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{12}$	2,5	2,1
<i>Escherichia coli</i>	$1,1 \cdot 10^{12}$	$5,3 \cdot 10^{12}$	3,7	3,0
<i>Brevibacterium sp.</i>	$5,5 \cdot 10^{11}$	$1,5 \cdot 10^{12}$	4,8	3,8
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	$2,2 \cdot 10^{14}$	$2,3 \cdot 10^{14}$	н.в.	3,8

Примітки. 1. Н.в. – не визначали. 2. Вихідне значення ПАР* культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1– 3,8.

У зв'язку з встановленим фактом біодеградації ПАР *R. erythropolis* перед нами постало завдання підбору біоцидів для їхнього захисту від руйнування сторонніми мікроорганізмами і власним продуцентом. З літератури відомо, що одним з найефективніших біоцидів, які попереджають біодеструкцію речовин мікробного походження, є формальдегід [1].

Таблиця 2.

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

Досліджені мікроорганізми	ПАР*	Ріст мікроорганізмів, КУО/мл
Мікроміцети		
<i>Aspergillus niger</i>	2,7	$1,1 \cdot 10^5$
<i>Penicillium nigricans</i>	0,9	$2,8 \cdot 10^5$
Дріжджі		
<i>Pichia pinus</i>	0,9	$6,5 \cdot 10^7$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,25	$2,1 \cdot 10^6$
<i>Candida scottii</i>	1,2	$0,9 \cdot 10^6$
Бактерії		
<i>Bacillus subtilis</i>	1,4	$8,0 \cdot 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	0,5	$2,1 \cdot 10^6$
<i>Brevibacterium sp.</i>	0,2	$2,0 \cdot 10^7$
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	1,4	$1,3 \cdot 10^{11}$

Вплив біоцидів на біодеградацію ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у процесі зберігання. У подальших експериментах досліджували здатність до біодеструкції ПАР, синтезованих при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі, мікрофлорою повітря та були визначені біоциди, здатні пригнічувати розвиток сторонньої мікрофлори. Встановлено, що при зберіганні стерильного суперна-

танту культуральної рідини в асептичних умовах протягом 110 діб показник умовної концентрації ПАР та емульгувальні властивості зразків не змінювалися (табл. 3).

Культуральна рідина, що не була оброблена біоцидами та зберігалася в нестерильних умовах приблизно на 45 добу інфікувалася бактеріями, що в подальшому призводило до зниження показника ПАР* (табл. 3).

Витримування культуральної рідини при зниженій температурі, дає змогу подовжити термін зберігання зразків. Так на 55 добу ПАР* залишається на рівні 2,4 (див. табл. 3). При цьому на 75 добу було зафіксовано інфікування зразка мікроміцетами роду *Penicillium*, що супроводжувалося потемнінням культуральної рідини.

У зразках, оброблених біоцидами (концентрація 0,3 та 0,5%) протягом 75 діб, не спостерігалось зниження умовної концентрації ПАР, а в деяких випадках фіксували навіть суттєве підвищення її рівня (див. табл. 3.) Підвищення ПАР* можна пояснити впливом формаліну на структуру біосурфактантів, що в свою чергу, супроводжувалося зміною їхніх поверхнево-активних властивостей. Зменшення концентрації біоцидів у зразках до 0,1 % спричиняє зниження ПАР* вже на 75 добу зберігання.

Рівень емульгувальної активності культуральної рідини упродовж чотирьох місяців зберігання суттєво не змінювався. Істотне зниження індексу емульгування спостерігалось лише на 110 добу для зразка культуральної рідини, що зберігався без обробки біоцидами та при зниженій температурі (див. табл. 3). На нашу думку, це зумовлено інфікуванням культуральної рідини мікроміцетами.

Паралельно було проведено дослідження біодеструкції ПАР, синтезованих при культивуванні штаму продуцента на гексадекані. Встановлено, що при зберіганні культуральної рідини упродовж 110 діб умовна концентрація ПАР в контролі та зразках, оброблених біоцидами, не знижувалась. Внесення еуксилу та формаліну пригнічує розвиток сторонньої мікрофлори в досліджуваних зразках щонайменше на чотири місяці (табл. 4).

**Вплив біоцидів на біодеструкцію поверхнево-активних речовин,
синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі**

Біоцид	Концентрація, %	ПАР*				Індекс емульгування культуральної рідини, %				КУО/мл	
		Тривалість зберігання, діб									
		7	45	75	110	7	45	75	110	45	110
Формалін	0,1	2,3	2,7	1,6	1,0	43,3	48,6	51,6	41,5	0	40
	0,3	2,3	2,7	3,2	1,3	45,8	43,3	53,8	46,8	0	0
	0,5	2,3	3,0	2,7	1,0	56,6	44,7	56,5	41,6	0	0
Еуксил	0,1	2,3	2,3	1,5	0,8	52,8	54,1	50,3	45,8	0	$1,5 \cdot 10^2$
	0,3	2,4	2,1	2,5	1,1	57,7	44,4	50,9	44,1	0	0
	0,5	2,4	2,2	2,2	1,1	40,8	41,8	49,5	48,4	0	0
Без біоцидів в умовах: асептичних	0	2,5	2,5	2,8	2,5	53,0	51,9	54,0	52,0	0	0
нестерильних	0	2,4	2,2	0,5	н.в.	62,7	74,0	71,9	н.в.	$6,3 \cdot 10^2$	$5,1 \cdot 10^7$
нестерильних, при зниженій температурі	0	1,9	2,9	1,3	0,5	57,2	49,8	66,4	3,75	0	$3,9 \cdot 10^4$

Примітки. 1. Н.в. – не визначали. 2. Вихідне значення ПАР* культуральної рідини – 2,5, індексу емульгування – 60,6 %. 3. Субстрат для емульгування – соняшникова олія. 4. Посівний матеріал вирощено на ГКА.

Не оброблені біоцидами зразки культуральної рідини, що зберігалися у неасептичних умовах приблизно на 45 добу інфікувалися мікроміцетами та бактеріями. При цьому на 75 добу було зафіксовано зниження умовної концентрації ПАР та спостерігалася зміна забарвлення культуральної рідини (від молочно-білого до прозорого з жовтим відтінком).

Треба зауважити, що зниження температури зберігання культуральної рідини до 5 °С дало змогу підтримувати поверхнево-активні характеристики зразків незмінними впродовж 75 діб (див. табл. 4).

Рівень індексу емульгування культуральної рідини суттєво не змінювався впродовж всього періоду зберігання зразків (див. табл. 4).

Висновки. Для попередження біодеструкції поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 нами запропоновано використовувати формалін або еуксил в концентрації 0,1 % – 0,3 %. Обидва досліджених біоциди виявляють високу активність до контамінуючої мікрофлори, що сприяє подовженню терміну зберігання культуральної рідини без втрати її властивостей та попередженню можливості появи резистентних форм до одного з них.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Пирог Т.П., Качан В.И., Малашенко Ю.Р., Гарейшина А.З., Юлбарисов Э.М. Биодеструкция экзополисахарида, синтезируемого *Acinetobacter sp.*, и подбор биоцидов, предотвращающих этот процесс // Микробиол. журн. – 1990. – **52**, № 2. – С. 35 – 39.
2. Пат. № 26495 UA, МПК С 02 F 3/34. Консорціум мікроорганізмів “Devouoil” (*Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida sp.*), що використовується для очищення ґрунтових та солонуватоводних екосистем від забруднення нафтопродуктами / І.А.Борзенков, Є.І.Мільохіна, С.С.Беляєв, М.В.Іванов. – Опубл. 11.10.99, Бюл. № 6.
3. Пирог Т.П. Біологічні функції мікробних екзополісахаридів // Микробиол. журн. 2001. – **63**, № 5. – С. 80 – 101.

**Вплив біоцидів на біодеструкцію поверхнево-активних речовин,
синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекані**

Біоцид	Кон- цент- рація,%	ПАР*				Індекс емульгування культуральної рідини, %				КУО/мл	
		Тривалість зберігання, дів									
		7	30	75	110	7	30	75	110	45	110
Формалін	0,1	2,6	2,9	2,4	2,4	33,7	25,5	32,5	38,8	0	0
	0,3	2,9	3,2	2,8	2,8	36,2	21,1	24,9	37,8	0	0
	0,5	2,5	2,5	2,9	3,0	47,1	29,5	38,3	60,9	0	0
Еуксил	0,1	3,1	3,0	3,1	2,9	36,9	38,0	29,5	43,8	0	0
	0,3	2,9	3,1	3,0	н.в.	37,9	32,7	42,1	н.в.	0	0
	0,5	3,1	3,1	2,7	2,9	37,5	48,2	45,8	33,3	0	0
Без біоцидів в умовах: асептичних	0	2,8	2,5	3,0	3,0	27,2	21,7	24,3	40,0	0	0
нестерильних	0	2,5	2,5	1,6	0,7	39,7	53,5	48,4	48,3	37	$2,9 \cdot 10^5$
нестерильних, при зниженій температурі	0	2,5	2,5	2,5	1,7	21,7	21,2	34,8	43,2	0	$2,1 \cdot 10^5$

Примітки. 1. Н.в. – не визначали. 2. Вихідне значення ПАР* культуральної рідини – 2,4, індексу емульгування – 32,5 %. 3. Субстрат для емульгування – соняшникова олія. 4. Посівний матеріал вирощено на ГКА.

4. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Игнатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане // Биотехнология. – 2005. – № 6. – С. 27 – 35.

5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.В. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикл. биохимия и микробиология. – 2004. – 40, № 5. – С. 544 – 550.

6. Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // Journal of Applied Microbiology. – 2002. – V.93. – P.915 – 929.

Одержана редколегією 15.03.06 р.