

TRANSFORMATION OF AROMATIC COMPOUNDS IN A SURFACTANT BY *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMV AL-5017, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 AND *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

T. Pirog, S. Antonuk, A. Sofilkanich
National University of Food Technologies

Key words:

Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017
Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241
Nocardia vaccinii IMV B-7405
Surfactants
Aromatic compounds

Article history:

Received 12.11.2015
Received in revised form 26.11.2015
Accepted 16.12.2015

Corresponding author:

T. Pirog
E-mail:
tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

The possibility of surfactants synthesis while growing *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on the aromatic substrates (phenol, benzene, naphthalene, toluene, hexachlorobenzene, benzoic, sulfanilic and N-phenylanthranilic acid) was investigated. It has been established that *R. erythropolis* IMV Ac-5017 is capable to transform phenol and toluene (0.5 %) to the extracellular metabolites with surface-active and emulsifying properties (conditional surfactant concentration and emulsification index were 1.3—3.3 % and 45—55 %, respectively). The highest rates of synthesis (2.0—2.5 % for conditional surfactant concentration and 60—75 % for emulsification index) were observed while growing *N. vaccinii* IMB B-7405 on phenol, benzene, naphthalene and N-phenylanthranilic acid (0.5 %). Cultivation of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 in a medium containing 0.5 % phenol and benzoic acid came along with the increase of conditional surfactant concentration up to 2.8—3.6 and emulsification index up to 55—75 %.

ТРАНСФОРМАЦІЯ АРОМАТИЧНИХ СПОЛУК У ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 І *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405

Т.П. Пірог, С.О. Антонюк, А.П. Софілканіч
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на ароматичних субстратах (фенол, бензол, нафталін, толуол, гексахлорбензол, бензойна, сульфанілова та N-фенілантранілова кислота). Встановлено, що *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 здатний трансформувати фенол і толуол (0,5 %) у поза-

клітинні метаболіти з поверхнево-активними й емульгуювальними властивостями (умовна концентрація ПАР та індекс емульгування становили 1,3—3,3 та 45—55 %, відповідно). Найвищі показники синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 (умовна концентрація ПАР 2,0—2,5, індекс емульгування 60—75 %) спостерігалися на фенолі, бензолі, нафталіні і *N*-фенілантранілової кислоти (0,5 %). Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з 0,5 % фенолу та бензойної кислоти супроводжувалось підвищенням умовної концентрації ПАР до 2,8—3,6, а індексу емульгування — до 55—75 %.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхнево-активні речовини, ароматичні сполуки.

Постановка проблеми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я щороку близько 13 млн смертельних захворювань є наслідком незадовільного екологічного стану довкілля [1]. Світова спільнота надзвичайно занепокоєна даною проблемою, в результаті чого залучає значні матеріальні, технічні та інтелектуальні ресурси для її вирішення. Тільки з 2006 р. по 2010 р. Національна комісія розвитку та реформ Китаю інвестувала близько 175 млрд дол. США на програми з удосконалення методів очищення навколишнього середовища від негативного антропогенного впливу [2].

Агентство з охорони навколишнього середовища США встановило, що ксенобіотики ароматичної природи (пестициди, діоксини та поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) належать до групи найнебезпечніших забруднювачів довкілля [2]. За угодою Стокгольмської конвенції від 29 квітня 2011 року про заборону й обмеження використання токсичних хімічних сполук, яку підтримало 170 країн світу, список стійких органічних забрудників нараховував 21 ксенобіотик, 8 з яких були ароматичної природи [3].

Ароматичні сполуки вперше знайшли практичне використання у хімічній промисловості у 50-х роках ХХ ст. [4, 5]. Враховуючи пластичність, адгезивність, виражені діелектричні властивості, стійкість до дії хімічних і фізичних факторів, вони одразу ж стали незамінними у нафтопереробній, коксохімічній, фармацевтичній, будівельній, деревообробній галузі та сільськогосподарському секторі [6]. Згідно зі статистичними даними [7], попит на сполуки ароматичної природи щороку підвищується. Так, з 1976 р. по 2008 р. потужність виробництва бензолу у світі зросла з 19 до 46 млн т/рік, при цьому аналітики прогнозують, що до 2020 р. даний показник становитиме близько 57 млн т/рік [7, 8].

Уже в 1950-х роках були опубліковані праці, присвячені вивченню участі мікроорганізмів у процесах розкладу вуглеводнів, зокрема й ароматичних [4, 5]. Починаючи з 70-х років ХХ ст., увагу дослідників усього світу привернула проблема пошуку ефективних методів очищення довкілля від сполук ароматичної природи [6, 9, 10]. Спочатку технології знешкодження ароматичних сполук ґрунтувалися на використанні фізичних, хімічних і фізико-хімічних способів, заснованих на сорбції, екстракції, коагуляції, флотації, тепловій адсорбції й окисненні органічних сполук [9]. На рубежі ХХ—ХХІ ст., з

розвитком науково-технічного прогресу [11—13] було показано, що біотехнології можуть стати альтернативою вищезгаданим розробкам завдяки безпечності, дешевизні та високому потенціалу штамів-деструкторів сполук ароматичної природи.

Аналіз літературних даних [2, 14, 15] показав, що здатність мікроорганізмів використовувати водонерозчинні субстрати зумовлюється поглинанням в результаті прямої або сурфактант-опосередкованої взаємодії клітин з гідрофобними сполуками.

У деяких випадках можуть функціонувати обидва шляхи, проте все ж таки в основному в процесах залучення до метаболізму ароматичних сполук беруть участь поверхнево-активні речовини, які здійснюють солюбілізацію й емульгування важкодоступних субстратів [16].

Мета статті. Дослідження синтезу ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 та *N. vaccinii* IMB B-7405 на ароматичних субстратах.

Матеріали і методи. Культивування бактерій *A. calcoaceticus* IMB B-7241 проводили на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaCl — 1,0; Na₂HPO₄ — 0,6; (NH₂)₂CO — 0,35; KH₂PO₄ — 0,14; MgSO₄·7H₂O — 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). Розчин мікроелементів містив (г/100 мл): ZnSO₄·7H₂O — 1,1; MnSO₄·H₂O — 0,6; ЕДТА (Трилон Б) — 0,5; FeSO₄·7H₂O — 0,1; CoSO₄·7H₂O — 0,03; H₃BO₃ — 0,006; CuSO₄·5H₂O — 0,004; KI — 0,0001.

Культивування бактерій *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ — 0,5—1,0; KH₂PO₄ — 0,1; MgSO₄·7H₂O — 0,1; CaCl₂·2H₂O — 0,1, pH 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і FeSO₄·7H₂O — 0,001 г/л. *R. erythropolis* IMB Ac-5017 вирощували на мінеральному поживному середовищі (г/л): NaNO₃ — 1,3; Na₂HPO₄ — 0,6; KH₂PO₄ — 0,14; MgSO₄·7H₂O — 0,1; NaCl — 0,1; FeSO₄·7H₂O — 0,001; pH 6,8—7,0.

Як єдине джерело вуглецю й енергії використовували фенол, гексахлорбензол, нафталін, бензойну, сульфанілову та N-фенілантранілову кислоту у концентрації 0,3—1,5 % (масова частка) та бензол і толуол у концентрації 0,3—1,5 % (об'ємна частка). Фенол і сульфанілову кислоту розчиняли у дистильованій воді і стерилізували в автоклаві 40 хв при 120 °С, а наважки гексахлорбензолу, нафталіну, бензойної та N-фенілантранілової кислоти попередньо кварцували впродовж 30 хв. Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на МПА.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28—30 °С упродовж 96 год.

Для оцінки кількісного вмісту ПАР в культуральній рідині використовували показник, названий «умовна концентрація ПАР». Цей показник визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на кривій залежності поверхневого натягу (σ_s) від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР.

Умовна концентрація ПАР виражається в безрозмірних одиницях і позначається надалі нами як ПАР*. Вимірювання поверхневого натягу здійснювали на напівавтоматичному аутотензіометрі TD1C LAUDA (Німеччина).

Для визначення індексу емульгування (E_{24} , %) до 2 мл постферментаційної культуральної рідини додавали 2 мл субстрату для емульгування (соняшникову олію) та струщували упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках.

Результати і обговорення. Дані про синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з різними концентраціями (0,5—1,5 %) ароматичних субстратів наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Синтез поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на середовищі з ароматичними сполуками

Субстрат	Концентрація субстрату (%)	Показники синтезу ПАР		
		pH	ПАР*	E_{24} , %
Фенол	0,5	6,7	3,3±0,2	43
	1,0	6,8	0,8	56
	1,5	7,3	0,3	40
Нафталін	0,5	6,8	0,6	48
	1,0	7,2	0,2	40
	1,5	7,4	0,2	40
Бензол	0,5	6,7	0,5	48
	1,0	6,8	0,2	45
	1,5	6,9	—	—
Толуол	0,5	6,5	1,3±0,1	40
	1,0	6,8	0,1	42
	1,5	7,1	—	—
Гексадекан (контроль)	2,0	7,0	4,8±0,2	70

Примітки: «—» — показники на рівні нуля, табл. 1—3: під час визначення індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %

Результати досліджень, наведені у табл. 1, показують, що штам ІМВ Ас-5017 може використовувати фенол і толуол у концентрації 0,5 % як джерело вуглецю й енергії для біосинтезу поверхнево-активних речовин (умовна концентрація ПАР становила 3,3 та 1,3, відповідно). Вищі концентрації фенолу й толуолу виявилися токсичною для *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Бензол і нафталін навіть у невисоких концентраціях інгібували біосинтез ПАР (ПАР* не перевищувала 0,6).

Враховуючи, що ароматичні сполуки у концентраціях вище 0,5 % інгібували синтез ПАР штамом ІМВ Ас-5017, у подальших дослідженнях *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували на середовищах з нижчими концентраціями субстратів (0,3—0,5 %) (табл. 2 і 3).

Таблиця 2. Утворення поверхнево-активних речовин під час вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на ароматичних субстратах

Субстрат	Концентрація, %	ПАР*	E_{24} , %
1	2	3	4
Фенол	0,3	1,8±0,09	50
	0,5	2,5±0,01	70

Продовження табл. 2.

1	2	3	4
Бензол	0,3	0,5±0,03	40
	0,5	2,0±0,1	60
Толуол	0,3	0,7±0,03	50
	0,5	0,9±0,04	55
Нафталін	0,3	2,4±0,12	50
	0,5	2,6±0,13	70
N-фенілантранілова кислота	0,3	2,1±0,1	40
	0,5	2,3±0,11	75
Гексахлорбензол	0,3	1,5±0,07	50
	0,5	2,0±0,1	55
Гліцерин (контроль)	0,3	1,4±0,07	50
	0,5	2,0±0,1	60

Таблиця 3. Синтез поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на ароматичних сполуках

Субстрат	Концентрація, %	ПАР*	E ₂₄ , %
Фенол	0,3	3,2±0,16	65
	0,5	3,6±0,18	75
Бензол	0,3	1,6±0,08	50
	0,5	1,5±0,08	50
Толуол	0,3	1,7±0,09	55
	0,5	1,2±0,06	50
Бензойна кислота	0,3	2,1±0,1	55
	0,5	2,8±0,14	52
N-фенілантранілова кислота	0,3	1,9±0,09	45
	0,5	2,0±0,1	50
Нафталін	0,3	1,1±0,05	45
	0,5	0	0
Сульфанілова кислота	0,3	1,0±0,05	40
	0,5	0	0
Гексахлорбензол	0,3	1,5±0,08	45
	0,5	1,7±0,09	53
Етанол (контроль)	0,3	0,8±0,04	40
	0,5	1,0±0,05	43

Як демонструють дані, наведені у табл. 2, утилізація ароматичних сполук *N. vaccinii* ІМВ В-7405 супроводжувалася утворенням позаклітинних метаболітів з поверхнево-активними й емульгувальними властивостями. Максимальні показники синтезу ПАР (ПАР* 2,3—2,6 та E₂₄ 70—75 %) спостерігалися за умов росту штаму ІМВ В-7405 на середовищі, що містили 0,5 % нафталіну, N-фенілантранілової кислоти та фенолу.

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 характеризувався здатністю до синтезу ПАР за умов росту на ширшому наборі ароматичних субстратів, ніж *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (див. табл. 1—3). Найвищі значення умовної концентрації ПАР (2,8—3,6) та індексу емульгування (до 75 %) досягалися у процесі культивування штаму ІМВ В-7405 на середовищі з 0,5 % фенолу й бензойної кислоти.

Аналіз літературних даних [17—20] показав, що мікроорганізми за умов росту на ароматичних сполуках здатні синтезували метаболіти з поверхнево-активними й емульгувальними властивостями. Так, *Brevibacillus* sp. PDM-3 [17] і *Pseudomonas* sp. USTB-RU [19] утворювали поверхнево-активні речовини під час культивування на фенатрені. У процесі вирощування дріжджів *Candida tropicalis* CEO17 на фенолі (0,5—1,0 %) індекс емульгування (з використанням гасу як субстрату) підвищувався до 40—45 % уже на 24 год росту [20]. У [17, 19, 20] зазначається, що здатність до синтезу таких позаклітинних метаболітів значно полегшує асиміляцію ароматичних субстратів мікроорганізмами.

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено можливість біоконверсії токсичних ароматичних сполук у поверхнево-активні речовини штамами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 та *N. vaccinii* ІМВ В-7405, що робить привабливим використання цих штамів у природоохоронних технологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків ароматичної природи.

Література

1. Bernstein A., Adar E., Nejidat A., Ronen Z. Isolation and characterization of RDX-degrading *Rhodococcus* sp. from a contaminated aquifer // *Biodegradation*. — 2011. — Vol. 42, # 5. — P. 208—215.
2. Haritash A.K., Kaushik C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // *J. Hazard. Mater.* — 2009. — Vol. 169, # 1—3. — P. 1—15.
3. Muffler K., Leipolda D., Schellera M., Haasb C., Steingroewerb J., Bleyb T., Ekkehard H., Miratad M., Schraderd J., Ulbera R. Biotransformation of triterpenes // *Process Biochemistry*. — 2011. — Vol. 46, # 1. — P. 1—15.
4. ZoBell C.E. Action of microorganisms on hydrocarbons // *Bacteriol. Rev.* — 1946. — Vol. 10, # 1—2. — P. 1—49.
5. ZoBell C.E. Assimilation of hydrocarbons by microorganisms // *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* — 1950. — Vol. 10. — P. 443—486.
6. Alexander M., Lustigman B. K. Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes // *J. Agric. Food Chem.* — 1966. — Vol. 14. — P. 410—413.
7. Tyagi M., da Fonseca M.M., de Carvalho C.C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // *Biodegradation*. — 2011. — Vol. 22, # 2. — P. 231—241.
8. Yang-Chun Y., Jian-Jiang Z. Recent advances in biodegradation in China: New microorganisms and pathways, biodegradation engineering, and bioenergy from pollutant biodegradation // *Process Biochemistry*. — 2010. — Vol. 45. — P. 1937—1943.
9. Evans W.C., Smith B.S., Moss P., Fernley H.N. Bacterial metabolism of 4-chlorophenoxyacetate // *Biochem J.* — 1971. — Vol. 122, # 4 — P. 509—517.
10. Gibson D.T., Hensley M., Yoshioka H., Mabry T.J. Formation of (1)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida* // *Biochemistry*. — 1970. — Vol. 9, # 7. — P. 1626—1630.
11. Coates J.D., Anderson R.T., Lovley D.R. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — Vol. 62, # 3. — P. 1099—1111.
12. Kastner M., Breuer-Jammali M., Mahro B. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1998. — Vol. 64, # 1. — P. 359—362.
13. Sandrin T.R., Chech A.M., Maier R.M. Rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — Vol. 66, # 10. — P. 4585—4588.

14. Groboillot A., Portet-Koltalo F., Le Derf F., Feuilloley M.J., Orange N., Poc C.D. Novel application of cyclolipopeptide amphiphin: feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — Vol. 12, # 3. — P. 1787—1806.
15. Liu Z., Zeng Z., Zeng G., Li J., Zhong H., Yuan X., Liu Y., Zhang J., Chen M., Liu Y., Xie G. Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum* // *Bioresour. Technol.* — 2012. — Vol. 110. — P. 468—473.
16. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium // *Food Bioprod. Process.* — 2013. — Vol. 91, # 2. — P. 149—157.
17. Reddy M.S., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan N.C., Dhanasri G., Devi P. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. // *Bioresour. Technol.* — 2010. — Vol. 101. — P. 7980—7983.
18. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* — 2011. — Vol. 12, # 1. — P. 633—654.
19. Masakorala K., Yao J., Cai M., Chandankere R., Yuan H., Chen H. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Pseudomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil // *J. Hazard. Mater.* — 2013. — Vol. 263, # 2. — P. 493—500.
20. Rocha L.L., de Aguiar Cordeiro R., Cavalcante R.M., do Nascimento R.F., Martins S.C., Santaella S.T., Melo V.M. Isolation and characterization of phenol-degrading yeasts from an oil refinery wastewater in Brazil // *Mycopathologia.* — 2007. — Vol. 164, # 4. — P. 183—188.

**ТРАНСФОРМАЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB AC-5017,
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 И
NOCARDIA VACCINII IMB B-7405**

Т.П. Пирог, С.О. Антонюк, А.П. Софилканич
Национальный университет пищевых технологий

*В статье исследовалась возможность синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) при выращивании *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на ароматических субстратах (фенол, бензол, нафталин, толуол, гексахлорбензол, бензойная, сульфаниловая и N-фенилантралиловая кислота). Установлено, что *R. erythropolis* IMB Ac-5017 способен трансформировать фенол и толуол (0,5 %) во внеклеточные метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами (условная концентрация ПАВ и индекс эмульгирования составляли 1,3—3,3 и 45—55 %, соответственно). Наиболее высокие показатели синтеза ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 (условная концентрация ПАВ 2,0—2,5, индекс эмульгирования 60—75 %) наблюдались на феноле, бензоле, нафталине и N-фенилантралиловой кислоте (0,5 %). Культивирование *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде с 0,5 % фенола и бензойной кислоты сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ до 2,8—3,6, а индекса эмульгирования — до 55—75 %.*

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, ароматические соединения.