

Т. А. Гринберг, В. Н. Буклова, Т. П. Пирог, В. И. Качан,
Ю. Р. Малащенко, А. З. Гарейшина, Э. М. Юлбарисов

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев;
ВНИИ ПКНефтехим, Киев; НПО Союзнефтеотдача, Уфа;
ВНИИ Нефтехимпроект, Казань

БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА, СИНТЕЗИРУЕМОГО *ACINETOBACTER SP.*, И ПОДБОР БИОЦИДОВ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИХ ЭТОТ ПРОЦЕСС

Изучена возможность биодеструкции экзополисахарида (ЭПС), синтезированного *Acinetobacter sp.*, чистыми культурами микроорганизмов и микрофлорой пластовой воды. Рекомендованы новые биоциды и подобраны их концентрации, предотвращающие на длительное время биодеструкцию ЭПС. Устранение биодеградации ЭПС позволит повысить эффективность его практического использования.

Известно, что полимерные молекулы под действием ряда факторов могут необратимо разрушаться, т. е. происходит деструкция или деградация полимерных молекул [2, 9, 10]. В результате деструкции уменьшается молекулярная масса препарата, снижается вязкость его растворов и соответственно — эффективность применения как загущающего агента. Различают химическую (в частности, окислительную), механическую и биологическую деструкцию. Микробные полисахариды, как правило, окислительной и механической деструкции мало подвержены [9, 10]. Наиболее распространенный вид деструкции экзополисахаридов (ЭПС) микробного происхождения — это разрушение их микроорганизмами как при хранении, так и при практическом использовании (например, в пластовой воде — для повышения нефтеотдачи пластов, в смазочно-охлаждающих жидкостях — в качестве присадки и т. д.) [6, 7]. Таким образом, биологическая деструкция полисахаридов является препятствием для эффективного их применения. Такие микробные ЭПС, как ксантан и склероглюкан, которые могут успешно использоваться в нефтедобывающей промышленности, в значительной степени подвержены биодеструкции. С другой стороны, ЭПС, синтезируемые *Acetobacter* и *Cryptococcus*, устойчивы к микробной деградации [7].

В связи с вышеизложенным цель наших исследований состояла в изучении биоразлагаемости полисахарида *Acinetobacter sp.* и подборе эффективных биоцидов для предотвращения этого процесса.

Материал и методы. В качестве объекта исследования служил ЭПС, синтезируемый *Acinetobacter sp.* Штамм селекционирован и хранится в отделе биологии газоокисляющих микроорганизмов ИМВ АН УССР. Характеристика продуцента и свойства ЭПС описаны ранее [3]. Для выделения ЭПС клетки бактерий осаждали центрифугированием при 9,5 тыс оборотов в течение 50 мин. Полученный супернатант диализировали против дистиллированной воды в течение 5 сут и осаждали тремя объемами 95 %-го этилового спирта. Выпавший осадок ЭПС промывали этанолом и сушили в вакууме. Экзопалисахарид состоит из остатков нейтральных сахаров — глюкозы, галактозы, маннозы и рамнозы (10:4:8:2) и кислого компонента — пировиноградной кислоты. В составе ЭПС обнаружены жирные кислоты — лауриновая, пальмитиновая, стеариновая и олеиновая в соотношении 10:29:12:7:20 [3].

В работе использовали высоковязкую культуральную жидкость с плазмолизированными клетками ($t=90^{\circ}\text{C}$, экспозиция 5 мин), а также 0,1 %-е растворы ЭПС.

При изучении способности микроорганизмов различных таксономических и физиологических групп ассимилировать ЭПС в качестве единственного источника углерода и энергии использовали чистые культуры аэробных и анаэробных бактерий, дрожжей, микромицетов, полученных из музея живых культур отделов физиологии промышленных микроорганизмов, биологии газоокисляющих микроорганизмов, физиологии и систематики микромицетов ИМВ АН УССР. Чистые культуры микроорганизмов были любезно предоставлены Т. М. Ключниковой, Е. Н. Громозовой, Н. Н. Ждановой и И. А. Элланской, за что выражаем им признательность. Культивирование микроорганизмов осуществляли на жидких селективных средах [1] в оптимальных для их роста условиях. В качестве источника углерода в опытном варианте использовали 0,1 %-й раствор экзополисахарида *Acinetobacter sp.*

При изучении биоразлагаемости ЭПС микрофлорой пластовой воды использовали высокоминерализованную пластовую воду (скважина 6087, Дюртюли, Башкирская

АССР). Качественный и количественный состав микрофлоры пластовой воды определяли путем посева на селективные питательные среды для выделения целлюлозоразрушающих, денитрифицирующих, сульфатредуцирующих, углеводородокисляющих и тионовых бактерий [1]. В качестве биоцидов применяли формалин, а также вазин (ТУ 6-09-4735-80), камцид (ТУ 381011081-86), тетрацид (ТУ 6-09-5281-86) и карбазин (ТУ 6-09-5349-87). Эти соединения готовят на формальдегидной основе, они не содержат фенолов и тяжелых металлов и являются различными производными 1,3,5-три (β-гидроксиэтил)-гексагидро-S-триазина. Они представляют собой однородную жидкость без посторонних примесей от светло-желтого до коричнево-вишневого цвета со слабым специфическим запахом. Эти соединения относятся к IV классу опасности (малоопасные вещества по ГОСТ 12.1.007-76), выпускаются на Шосткинском заводе химреактивов.

Для определения чувствительности микроорганизмов к биоцидам осуществляли анаэробное культивирование хромвосстанавливающих и сульфатредуцирующих бактерий; микромицеты *Penicillium viridicatum* и *Fusarium culmorum*, бактерии *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter calcoaceticus* выращивали в аэробных условиях. Культивирование осуществляли на селективных средах в течение 48 ч. Для установления оптимальных концентраций биоцидов к суспензии микроорганизмов (10^9 клеток в 1 мл) добавляли биоциды в концентрации 0,05—1,0 %. Учет жизнеспособности клеток проводили через 2, 24 и 240 ч экспозиции путем посева клеточных суспензий на селективные агаризованные среды.

О биодеструкции ЭПС, синтезируемого *Acinetobacter* sp., судили по изменению вязкости его растворов при хранении, а также по наличию микробного роста в пробах. Биоциды вносили в концентрации 0,1—0,5 %. Опытные и контрольные (без биоцидов) растворы ЭПС выдерживали в течение полугодия при комнатной температуре. Пробы для определения вязкости и микробиологического контроля отбирали через каждые 3 дня в течение первых двух недель, затем каждые 10 дней на протяжении 2 мес и раз в месяц в течение полугодия со дня постановки эксперимента. Вязкость измеряли на капиллярном вискозиметре Оствальда при 20 °С. Наличие микроорганизмов, способных к биодеструкции ЭПС *Acinetobacter* sp., определяли путем посева исследуемых проб на агаризованную и жидкую минеральную среду, содержащую ЭПС в качестве источника углеродного питания. Культивирование микроорганизмов осуществляли при комнатной температуре в течение 14 дней в аэробных и анаэробных условиях.

Результаты и их обсуждение. Известно, что синтезируемые некоторыми видами микроорганизмов ЭПС могут быть использованы как самими продуцентами, так и сопутствующей микрофлорой в качестве источника углеродного питания [5, 7, 8]. В связи с этим мы исследовали возможность ассимиляции ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углерода и энергии как самим продуцентом, так и микроорганизмами различных физиологических и таксономических групп. Установлено, что *Acinetobacter* sp. не использует синтезируемый ЭПС в качестве источника углеродного питания (табл. 1). Только ограниченный круг микроорганизмов из проверенных различных таксономических и физиологических групп может использовать ЭПС *Acinetobacter* sp. Это, в первую очередь, микромицеты, анаэробные сульфатредуцирующие и хромвосстанавливающие бактерии и некоторые аэробные гетеротрофы (см. табл. 1).

В связи с установленным фактом биодеградации ЭПС перед нами стояла задача подбора биоцидов для защиты его от разрушения аэробной и анаэробной микрофлорой. В литературе отмечается, что из ряда исследованных биоцидов, предотвращающих биодеструкцию ксантана и склероглюкана, наиболее эффективным оказался формальдегид [9, 10]. Кроме формальдегида нами были апробированы в качестве биоцидов вещества на формальдегидной основе, выпускаемые в СССР и доступные для применения их в практических целях.

Результаты исследований показали, что наиболее высокой бактерицидной дозой для микромицетов является 0,5—1,0 %, для аэробных бактерий — 0,1—0,3 %; наиболее чувствительны к биоцидам анаэробные микроорганизмы (табл. 2). Бактерицидный эффект наблюдается через 2 ч после внесения указанных концентраций биоцидов и сохраняется в течение длительного времени.

В дальнейших экспериментах исследовали влияние указанных доз биоцидов на биодеструкцию ЭПС *Acinetobacter* sp. как при хранении, так и при воздействии микроорганизмов пластовой воды.

В настоящее время обсуждается возможность использования для вторичной добычи нефти высоковязкой культуральной жидкости после выращивания продуцента. Такая культуральная жидкость, содержащая

ЭПС, должна быть устойчива к биоразложению в процессе ее хранения и транспортировки. В связи с этим исследовали биодеструкцию культуральной жидкости *Acinetobacter* sp. В качестве контроля использовали стерильный и хранящийся в стерильных условиях образец. В опытные образцы вносили биоциды в концентрациях, оптимальных для подавления роста грибной микрофлоры. Установлено (табл. 3), что при хранении в течение 4 мес вязкость культуральной жидкости в контроле и образцах, обработанных формалином и камцидом, не изменяется. Культуральная жидкость, не обработанная биоцидами и хранящаяся в асептических условиях, на 5—6-е сутки инфицировалась микромицетами (что сопровождалось снижением ее вязкости) либо сульфатредуцирующими бактериями. При этом на 10—12-е сутки наблюдали почернение культуральной жидкости и снижение ее вязкости. Применение остальных биоцидов позволяло сохранять вязкостные характеристики исследуемых образцов неизменными в течение 2 мес, а затем отмечали некоторое снижение вязкости. При этом из образцов не были выделены ни анаэробные, ни аэробные бактерии, ни микромице-

Таблица 1. Способность микроорганизмов различных физиологических и таксономических групп ассимилировать экзополисахарид *Acinetobacter* sp. в качестве единственного источника углерода и энергии

Исследуемые микроорганизмы	Количество исследованных штаммов	Рост на ЭПС	Исследуемые микроорганизмы	Количество исследованных штаммов	Рост на ЭПС
Бактерии			Дрожжи		
Сульфатредуцирующие			<i>Candida tropicalis</i>	2	—
Неидентифицированные штаммы	2	+	<i>Candida utilis</i>	2	—
Хромовосстанавливающие			<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	+	<i>Hansenula polymorpha</i>	1	—
Денитрифицирующие			<i>Pichia pinus</i>	1	—
Неидентифицированные штаммы	3	+	<i>Rhodospiridium diobovatum</i>	1	—
Тионовые			Микромицеты		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	2	—	<i>Stemphylium</i> sp.	1	+
Целлюлозоразрушающие			<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	+
Неидентифицированные штаммы			<i>Aureobasidium</i> sp.	1	+
анаэробные	2	—	<i>Penicillium frequentans</i>	1	+
аэробные	2	—	<i>Penicillium viridicatum</i>	1	+
Углерододассимилирующие			<i>Penicillium lanosum</i>	1	+
<i>Rhodococcus luteus</i>	2	—	<i>Fusarium sambucinum</i>	1	—
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	3	—	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	+
<i>Rhodococcus rubra</i>	1	—	<i>Fusarium culmorum</i>	1	+
Другие гетеротрофные			<i>Aspergillus niger</i>	1	+
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	—			
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	—			
<i>Bacillus subtilis</i>	1	—			
<i>Bacillus mucilaginosus</i>	2	—			
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	+			
<i>Micrococcus</i> sp.	1	—			
Неидентифицированные штаммы	3	+			

Таблица 2. Оптимальные концентрации биоцидов, подавляющие рост различных групп микроорганизмов

Биоцид	Концентрации биоцидов (%), подавляющие рост		
	аэробных бактерий	анаэробных бактерий	микромицетов
Формалин	0,1	0,05	1,0
Вазин	0,3	0,01	0,3
Карбазин	0,1	0,05	0,1
Камцид	0,2	0,01	0,5
Тетрацид	0,3	0,05	0,5

ты. В незначительном количестве выделяли аэробные гетеротрофы и среди них не было штаммов, ассимилирующих ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углерода и энергии.

В связи с возможностью биодеструкции ЭПС *Acinetobacter* sp. микрофлорой пластовой воды при использовании биополимера для повышения нефтеотдачи пластов нами исследован качественный и количественный состав микрофлоры пластовой воды (скважина 6087, Дюртюли, Башкирская АССР). Минерализация исследуемой пластовой воды составляет 120 г/л, рН 7,0, еН — +260 мВ. В пластовой воде обнаружены микроорганизмы (клеток в 1 л): сульфатредуцирующие — $2,8 \cdot 10^3$, тионовые — $2,8 \cdot 10^3$, углеводородассимилирующие — $3,2 \cdot 10^3$, олигокарбофильные — $4,5 \cdot 10^3$, растущие на МПА гетеротрофные бактерии — $2,0 \cdot 10^3$.

В этой серии экспериментов исследовали биодеструкцию 0,1 %-х растворов ЭПС. Растворы ЭПС готовили на стерильной водопроводной воде, в опытные образцы вносили 10 % пластовой воды и биоцид в концентрации 0,1—0,3 %. Контролем служил образец, обработанный пластовой водой, без биоцидов. Установлено, что микрофлора пластовой воды в течение 10 дней полностью деструктурирует ЭПС; при этом вязкость растворов снижается до вязкости воды. В данном эксперименте эффективными биоцидами (подавляющими рост микроорганизмов) оказались вазин и карбазин. Они подавляют в течение 6—7 мес рост микрофлоры пластовой воды и сохраняют свойства ЭПС неизменными (табл. 4).

Таким образом, для стабилизации растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. и предотвращения их биодеструкции рекомендуем применять формалин или камцид в концентрации 0,2 и 0,5 % соответственно при хранении высоковязкой культуральной жидкости и после разведения куль-

Таблица 3. Влияние биоцидов на биоразлагаемость культуральной жидкости *Acinetobacter* sp. при хранении

Биоцид	Концентрация, %	Вязкость, сСт							
		Время хранения, сут							
		1	3	10	20	40	60	100	180
Вазин	0,3	138,7	140,1	120,5	82,6	82,6	40,4	н. о.	н. о.
Карбазин	0,1	140,0	142,3	144,4	96,4	н. о.	н. о.	н. о.	н. о.
Формалин	0,5	129,9	130,1	135,4	135,4	140,1	140,4	140,4	140,5
Камцид	0,5	165,2	168,1	164,3	168,1	165,4	164,3	165,2	169,4
Тетрацид	0,5	110,0	110,0	112,1	112,5	100,4	50,2	н. о.	н. о.
Без биоцида	—	125,5	125,5	108,4	60,2	2,4	н. о.	н. о.	н. о.
Без биоцида в стерильных условиях	—	125,5	125,5	120,4	122,6	128,4	125,3	124,1	125,0

Примечание: н. о.—не определяли.

Таблица 4. Биоразлагаемость 0,1 %-го раствора экзополисахарида *Acinetobacter* sp. микрофлорой пластовой воды в присутствии биоцидов

Биоцид	Концентрация, %	Вязкость, сСт							
		Время хранения, сут							
		1	3	10	20	40	60	100	180
Вазин	0,3	6,2	6,2	6,5	6,5	6,2	6,0	6,0	6,0
Карбазин	0,1	7,0	7,0	6,9	7,2	7,0	6,8	6,5	6,0
Формалин	0,1	6,2	7,0	7,0	7,0	4,0	3,0	3,0	3,0
Камцид	0,2	7,0	7,0	7,0	7,0	3,8	3,0	1,0	1,0
Тетрацид	0,3	7,0	7,0	7,0	7,0	3,2	3,0	2,0	1,0
Без биоцида	—	7,0	3,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

туральной жидкости перед закачкой ее в пласт проводить обработку вазином или карбазином (0,1 %). Такое комбинированное применение биоцидов позволяет длительное время сохранять ЭПС *Acinetobacter* sp. без потери его реологических свойств и предотвращать возможность появления резистентных форм к одному из биоцидов.

T. A. Grinberg, V. N. Buklova, T. P. Pirog, V. I. Kachan,
Malashenko Yu. R., Gareishina A. Z., Yulbarisov E. M.

Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev;
Research Institute of Production Complex «Neftekhim», Kiev;
Scientific Production Amalgamation «Souznefteotdacha», Ufa;
All-Union Research Institute «Neftekhimproekt», Kazan

BIODESTRUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIZED BY *ACINETOBACTER* SP. AND SELECTION OF BIOCIDES PREVENTING THIS PROCESS

Summary

An exopolysaccharide (EPS), synthesized by *Acinetobacter* sp., has been studied for the possibility of its biodestruction by pure cultures of microorganisms and microflora of stratal water. New biocides are recommended and their concentrations preventing biodestruction of EPS for a long time are selected. The removal of the EPS biodegradation will permit increasing the efficiency of its practical use.

1. Большой практикум по микробиологии / Под ред. Г. Л. Селибера. — М.: Высш. шк., 1962. — 491 с.
2. Гарейшина А. З., Матышевская М. С., Мавзютова И. П. и др. Микрофлора пластовых вод, участвующая в деструкции биополимерных растворов // Микробиол. журн. — 1986. — 48, № 1. — С. 41—46.
3. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопецева Н. В. и др. Некоторые свойства полисахарида, синтезируемого культурой *Acinetobacter* sp. // Там же. — 1987. — 49. — С. 24—30.
4. Дуда В. И. Obligатные анаэробные бактерии: многообразие, классификация, методы выделения и культивирования // Технические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. — Пушкино: НЦБИ АН СССР, 1978. — С. 7—45.
5. Егоров Н. С., Гречушкина Н. И., Гоголева Е. В., Рассадин А. О. О физической функции свободного экзополисахарида *Mycobacterium lacticolium* // Микробиология. — 1978. — 47, № 2. — С. 241—245.
- ✓ 6. Качан В. И. Повышение устойчивости смазочно-охлаждающих жидкостей к микробному поражению // Станки и инструменты. — 1987. — № 6. — С. 25—26.
- ✓ 7. Мавзютова И. П., Гарейшина А. З., Матышевская М. С. и др. Биодеструкция экзополисахаридов микроорганизмами закачиваемой и пластовой вод // Микробиол. журн. — 1987. — 49, № 6. — С. 31—35.
8. Мальцева Н. Н. Экзополисахариды олигонитрофильных бактерий как фактор, обуславливающий образование микробных сообществ почвы // Микробные сообщества и их функционирование в почве. — Киев: Наук. думка, 1981. — С. 36—42.
- ✓ 9. Kohler N., Chauveteau J. Xanthan polysaccharide fluiding behaviour in porous media — preferential use fermentation broth // J. Petrol., Feb. — 1981. — N 2. — P. 349—357.
- ✓ 10. Rehage D. G., Block H., Wehrhann A. K. Physico-chemical investigation on polymer-flood media // Part 5 of DGMK-project 295 basic investigation for the selection and preparation of field application of tertiary oil recovery by chemical flooding (Hamburg, October, 1987). — 1987. — P. 97—105.

Получено 19.04.89

УДК 679.842.23.222

Н. В. Коробейник, В. С. Цивин, А. Н. Кравченко, Л. А. Абрамова
Ростов н/Д науч.-исслед. противочум. ин-т

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАН *YERSINIA PESTIS*

Разработан метод фракционирования мембранных структур *Yersinia pestis*, включающий основные этапы: выращивание бактерий в жидкой питательной среде, механическое разрушение из твердого состояния в X-прессе или обработку суспензии ультра-