

А.Д. Конон, А.П. Софилканич, К.А. Покора, С.А. Парфенюк, Т.П. Пирог

БИОУТИЛИЗАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ С ПОЛУЧЕНИЕМ МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

A.D. Konon, A.P. Sofilkanych, Kh.A. Pokora, S.A. Parfenyuk, T.P. Pirog

BIOUTILIZATION OF INDUSTRIAL WASTES WITH PRODUCTION OF MICROBIAL SURFACTANTS WITH MULTIFUNCTIONAL APPLICATION

Исследовано возможность увеличения синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 и *Nocardia vaccinii* K-8 при росте на некоторых промышленных отходах (меласса, жидкие парафины, пережаренное подсолнечное масло). Так, количество синтезированных ПАВ увеличивалось в 1,5-2,5 раза по сравнению с культивированием на *n*-гексадекане, этаноле и глицерине. Показано возможность применения ПАВ как антимикробных и антиадгезивных агентов, а также препаратов для очистки окружающей среды от нефти и тяжелых металлов.

Ключевые слова: микробные поверхностно-активные вещества, биоутилизация отходов, биодеструкция нефти.

The ability of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 to increase the synthesis of surfactants on some industrial waste (molasses, liquid paraffin, fried sunflower oil) was established. Thus, the rates of surfactants biosynthesis increased by 1.5-2.5 folds compared to cultivation on *n*-hexadecane, ethanol and glycerol. It was shown that surfactant can be used as effective antimicrobial and antiadhesive agents and as preparations for environment remediation from pollution by crude oil and heavy metals.

Keywords: biosurfactants, bioutilization of wastes, biodestruction of oil.

Введение

Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) способны снижать поверхностное и межфазное натяжение, сорбировать тяжелые металлы, повышать эффективность разложения нефтяных загрязнений экосистем, проявлять антимикробное и антиадгезивное действие против патогенных микроорганизмов. Благодаря уникальным свойствам, ПАВ микробного происхождения могут использоваться в различных отраслях промышленности [Туаги М., 2011]. Целесообразность их практического применения зависит от экономической эффективности производства. Одним из способов удешевления технологий микробных ПАВ является использование дешевых ростовых субстратов, например, отходов других производств [Cameotra S.S., 2010; Hazra C., 2011; Makkar R.S., 2011].

Ранее из загрязненных нефтью образцов почвы были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ B-7241 и *Nocardia vaccinii* K-8, установлена способность данных

штаммов синтезировать поверхностно-активные вещества на традиционных гидрофильных и гидрофобных субстратах [Pirog T.P., 2004; Pirog T. P., 2009; Pirog T.P., 2011].

Цель данной работы — исследование возможности использования отходов различных производств в качестве дешевых ростовых субстратов для синтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vaccinii* К-8, а также определение антимикробных и антиадгезивных свойств этих препаратов и возможности использования для ремедиации экосистем от нефти и тяжелых металлов.

Материалы и методы

В качестве источника углерода и энергии использовали молочную сыворотку, пепрежаренное и рафинированное подсолнечное масло, а также мелассу. В контрольных вариантах штамм ИМВ В-7241 культивировали на среде с этанолом, ИМВ Ас-5017 — *n*-гексадеканом, К-8 — глицерином. Способность бактерий к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям как концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости и условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %), описанным в предыдущих работах [Pirog T.P., 2004; Pirog T. P., 2009; Pirog T.P., 2011].

Препараты ПАВ в виде постферментационной культуральной жидкости (5 %) использовали для очистки загрязненных нефтью воды (2,6 г/л) и почвы (21,4 г/кг). Для исследования антимикробных и антиадгезивных свойств использовали стерильный супернатант культуральной жидкости, а *Bacillus subtilis* BT-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Candida tropicalis* PBT-5, *Candida albicans* D-6, *Staphylococcus aureus* BMC-1, *Saccharomyces cerevisiae* OB-3 и *Aspergillus. niger* P-3 — как тест-культуры.

Исследование антимикробных свойств ПАВ проводили с использованием суспензийной культуры. Для этого 1,5 мл суспензии тест-культуры вносили в пробирку, добавляли 1,5 мл препарата и выдерживали 1 или 2 ч при оптимальной для роста культуры температуре. Количество живых клеток определяли по методу Коха [Pirog T.P., 2011]. Для оценки антиадгезивных свойств препаратов ПАВ исследовали соотношение количества адгезированных клеток на предварительно обработанных ПАВ образцах к числу клеток на контрольных образцах.

Результаты и обсуждение

Показано, что *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vaccinii* К-8 способны синтезировать ПАВ на всех исследованных субстратах, кроме молочной сыворотки (рис. 1).

Максимальные показатели биосинтеза ПАВ были зафиксированы при культивировании штаммов ИМВ Ас-5017, ИМВ В-7241 и К-8 на маслосодержащих субстратах: повышение условной концентрации ПАВ в 1,5-2,5 раза по сравнению с показателями на среде с *n*-гексадеканом, этанолом или глицерином. При использовании мелассы в качестве источника углерода для штаммов ИМВ В-7241 и К-8 наблюдали увеличение количества синтезированных ПАВ на 80-196 %, а жидких парафинов — на 40 % по сравнению с выращиванием на этанол- и глицеринсодержащих средах.

▨ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 ▩ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 ▤ *N. vaccinii* К-8

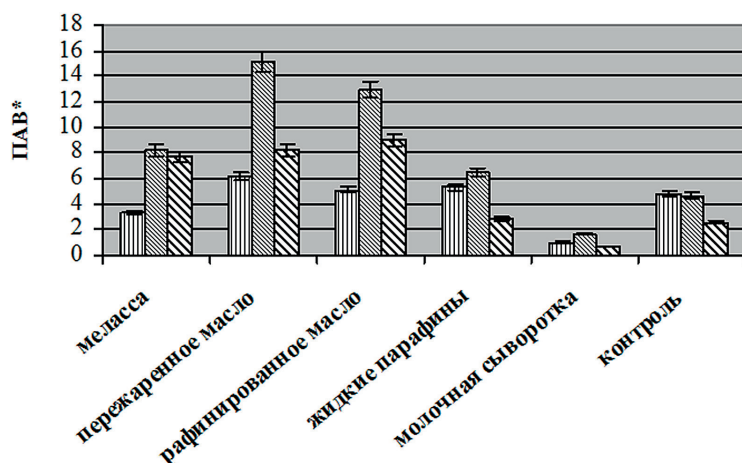


Рис. 1. Синтез поверхностно-активных веществ при культивировании *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vaccinii* К-8 на альтернативных субстратах.

Установлено, что препараты ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vaccinii* К-8 в виде постферментационной культуральной жидкости интенсифицируют процессы деструкции нефти в загрязненной воде и почве. На 30 суток степень очистки воды от нефти после обработки препаратами ПАВ составляла 83-92 % (рис. 2), а почвы — 51-86 %.

Однако загрязнения в экосистемах зачастую носят комплексный характер (нефть и катионы тяжелых металлов), поэтому на следующем этапе исследовали влияние препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на деструкцию нефти в почве и воде в присутствии Cu^{2+} . Установлено, что при наличии Cu^{2+} (0,01-0,5 мМ) и ПАВ штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 степень биодеструкции нефти в загрязненной воде и почве через 30 суток составляла 95-98 % и 91-92 %, соответственно.

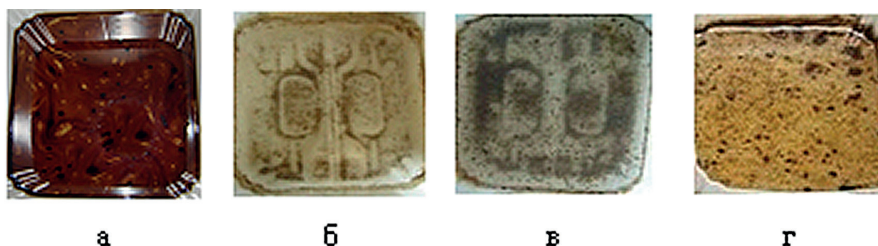


Рис. 2. Деструкция нефти на 30 суток после обработки препаратами ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (б), *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (в), *N. vaccinii* К-8 (г), а — контроль (без препаратов ПАВ).

Мы предполагаем, что положительная роль Cu^{2+} в биодеструкции нефти обусловлена стимулирующим влиянием катионов меди на активность алкангидроксилаз — первых ферментов катаболизма углеводов у обоих штаммов (ИМВ В-7241, ИМВ Ас-5017) и природной нефтеокисляющей микрофлоры. Эксперименты показали, что в присутствии 0,01 и 0,05 мМ Cu^{2+} активности алкангидроксилаз штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 повышалась в 1,5–3 раза.

Установлено антимикробное действие ПАВ штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 по отношению к ряду бактериальных и дрожжевых тест-культур. Наиболее эффективное антимикробное действие препараты ПАВ проявляли против *B. subtilis* ВТ-2. В присутствии препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (в концентрации 0,98 мг/мл) гибло более 90 % клеток тест-культуры через 1 ч экспозиции, а добавление препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (0,22 мг/мл) приводило к 100 % гибели клеток *B. subtilis* ВТ-2 независимо от времени экспозиции (таблица).

Таблица 1

Антибактериальное действие препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на выживание *B. subtilis* ВТ-2

Продуцент ПАВ	Концентрация ПАВ в препаратах, мг/мл	Выживание (%) через	
		1 ч	2 ч
<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017	0,61	55,0±2,7	53,0±2,6
	0,98	1,95±0,1	1,8±0,09
<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	0,15	1,4±0,07	0,52±0,03
	0,22	0	0

Примечание. Количество клеток *B. subtilis* ВТ-2 в исходной суспензии до внесения препаратов составляла $4 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Показано, что антимикробное действие ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 против *B. subtilis* ВТ-2 зависело от физиологического состояния тест-культуры. Так, препараты ПАВ были более эффективными против споровой культуры (снижение выживания клеток на 75 % через 2 ч экспозиции), чем вегетативных клеток (снижение на 47 % через 2 ч).

Установлено, что количество клеток *C. tropicalis* РВТ-5 в присутствии ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 снижалось на 80 % с увеличением концентрации ПАВ до 1,44 мг/мл и продолжительности обработки до 2 ч. Выживание клеток *C. albicans* D-6 при обработке ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (0,92 и 1,44 мг/мл) составляло 26–33 и 44–77 % соответственно. Аналогично, в присутствии ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 количество живых клеток *C. albicans* D-6 увеличивалось с 71 % до 89 % с увеличением концентрации от 0,15 мг/мл до 0,22 мг/мл. Таким образом, не всегда более высокие концентрации ПАВ оказываются более эффективными.

На следующем этапе исследований мы показали, что ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 усиливают антимикробное действие масла чайного дерева на некоторые микроорганизмы (*C. albicans* D-6, *A. niger* P-3, *S. aureus* ВМС-1) благодаря собственным как

антимикробным, так и эмульгирующим свойствам. Установлено, что при одновременном внесении в суспензию исследованных тест-культур (10^4 – 10^5 клеток/мл) эмульсии на основе масла чайного дерева (12,5 мкл/мл) и ПАВ (0,43 мг/мл) количество живых клеток через 15 мин экспозиции была на 0,7–66 % ниже, чем при обработке суспензии микроорганизмов препаратами масла без поверхностно-активных веществ.

Показано, что препараты ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 обладают и антиадгезивными свойствами. Они снижали количество прикрепленных клеток *B. subtilis* БТ-2 на линолеуме и кафеле на 82,4 и 41,3 % соответственно. Также препараты ПАВ снижали адгезию *E. coli* ИЭМ-1 на стальные пластинки (на 41 %), пластик (15 %) и кафель (14 %). Показано, что антиадгезивная активность препаратов ПАВ зависит от физиологического состояния клеток *B. subtilis* БТ-2. Так, с увеличением возраста культуры адгезивные свойства уменьшались.

Заключение

Таким образом, в данной работе показана возможность утилизации промышленных отходов с получением практически ценных поверхностно-активных веществ мультифункционального назначения, которые могут быть использованы для очистки от нефти воды и почвы, а также в качестве эффективных антимикробных и антиадгезивных агентов.

Литература

1. Cameotra S.S., Makkar R.S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants // Pure Appl Chem, 2010, v. 82, p. 97–116.
2. Hazra C., Kundu D., Ghosh P., Joshi S., Dandi N., Chaudhari A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using low-cost agro-based raw materials // J Chem Technol Biotechnol, 2011, v. 86, p. 185–198.
3. Makkar R.S., Cameotra S.S., Banat I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production // AMB Express, 2011, v. 1, № 5, p. 1–19.
4. Pirog T.P., Antonyuk S.I., Karpenko E.V., Shevchuk T.A. The effect of the cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain on the synthesis of surfactants // Appl. Biochem. Microbiol, 2009, v. 45, № 3, p. 304–310.
5. Pirog T.P., Grytsenko N.A., Khomyak D.I., Konon A.D., Antonyuk S.I. Optimization of surface-active substances synthesis by *Nocardia vaccinii* K-8 during bioconversion of wastes of biodiesel production // Microbiologichny Zhurnal (in russian), 2011, v. 73, № 4, p. 15–24.
6. Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanych A.P., Skochko A.B. Antimicrobial effect of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV AC-5017 // Microbiologichny Zhurnal (in russian), 2011, t. 74, № 3, p. 14–20.
7. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Volishina I.N., Karpenko E.V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates // Appl. Biochem. Microbiol. (Engl. Transl.), 2004, v. 40, № 5, p. 470–475.
8. Tyagi M., Fonseca M.M., Carvalho C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // Biodegrad, 2011, № 22, p. 231–241.