

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* К-4 НА ЕФЕКТИВНІСТЬ МІКРОБНОЇ ДЕСТРУКЦІЇ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ

Показана можливість використання препаратів поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, для очищення води від нафти. Через 30 діб ступінь деградації нафти (2,6 г/л) за присутності 5–30 % (об'ємна частка) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатанту становила 81–95 %. Інтенсифікація деградації нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, деградація нафти, очищення води, активація нафтоокиснювальної мікрофлори.

Одним із можливих шляхів очищення ґрунтів і води від нафтопродуктів є активація природної мікрофлори забруднених об'єктів. Особливо доцільний такий спосіб для застарілих забруднень. Природні механізми самоочищення сприяють розвитку специфічної нафтоокиснювальної мікрофлори на забруднених ділянках. Велике значення має економічний аспект таких технологій, оскільки використання природної мікрофлори суттєво знижує вартість процесів очищення, не потребує багатотонажного виробництва біопрепаратів і технічних витрат на обробку. Проте за високих концентрацій нафти і нафтопродуктів у ґрунті і воді природні процеси біоутилізації здійснюються дуже повільно.

Потужним регулятором активності мікробної популяції, у тому числі й природної, здатної до окиснення гідрофобних сполук, є поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема ПАР мікробного походження [12]. Емульгування (солюбілізація) вуглеводнів за допомогою ПАР сприяють транспорту гідрофобних речовин з ґрунту і води у мікробні клітини і, таким чином, підвищують їх здатність до деградації. У багатьох працях повідомляється про здатність мікробних ПАР інтенсифікувати деградацію нафтопродуктів як у лабораторних, так і польових умовах [4, 5, 8, 10, 12].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту нами було ізольовано штамп бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 [1]. Встановлено умови культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі, що забезпечують підвищення у три рази показників синтезу поверхнево-активних речовин [2].

Мета даної роботи – дослідити можливість інтенсифікації процесу очищення води від нафти за присутності препаратів ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* К-4.

Матеріали і методи. Об'єкти досліджень. Основним об'єктом досліджень був штамп нафтоокиснювальних бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, виділений із забрудненого нафтою ґрунту [1].

Культивування *A. calcoaceticus* К-4. Штамп *A. calcoaceticus* К-4 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_3)_2\text{CO}$ – 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, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка [5]). 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 температурі 30°C упродовж 120 год.

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

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.

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю ПАР *A. calcoaceticus* K-4 проводили на модельній водоймі, якою слугувала ємність з 2 л бюветної води. На поверхню води наносили 2,6 г/л нафти, а потім – препарати ПАР у концентрації 5 і 15 % від об'єму води. Як джерело біогенних елементів, необхідних для життєдіяльності нафтоокиснювальних бактерій, використовували діамонійфосфат у концентрації 0,01 % від об'єму води. В одному з варіантів через тиждень здійснювали повторну обробку води препаратами ПАР у концентрації 5 і 15 %.

Загальну кількість живих клітин (КУО/мл) визначали за методом Коха на середовищі МПА у бюветній воді (до забруднення нафтою), а також у всіх зразках після закінчення експерименту (30 діб).

Вміст нафти у воді визначали ваговим методом після трикратної екстракції гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові при температурі 55 °С.

Результати та їх обговорення. Основною перевагою застосування мікробних ПАР для деградації нафтових забруднень є те, що вони не посилюють токсичність нафтопродуктів, а також частково емульгують нафту, чим підвищують її доступність для мікроорганізмів. Їх використання відзначається низькими експлуатаційними витратами, простим обслуговуванням, надійністю очистки, що зумовлює практично повну деградацію органічних сполук до оксидів вуглецю, азоту та ін. На противагу мікробним ПАР, використання хімічних засобів завдає великої шкоди екосистемам та сповільнює відновлення. Пропонують різноманітні варіанти застосування мікробних ПАР у процесах очищення: використання мікроорганізмів-продуцентів ПАР для утилізації нафти та продуктів її переробки; обробка забрудненої зони розчинами ПАР для солюбілізації вуглеводнів, що стимулює розвиток природної мікрофлори; очищення найбільш забруднених ділянок із застосуванням біореакторів, у яких здійснюється пряме очищення ґрунту розчинами ПАР [5, 15, 18].

Наші попередні дослідження показали, що за умов росту на етанолі *A. calcoaceticus* K-4 утворює комплекс метаболітів з емульгуювальними і поверхнево-активними властивостями [2]. Встановлено, що даний штам бактерій синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР. Поверхнево-активні речовини, екстраговані з клітин *A. calcoaceticus* K-4, представлені гліко- і нейтральними ліпідами. Основними компонентами ПАР, виділених із культуральної рідини, є гліко-, аміно- і нейтральні (неполярні) ліпіди (ймовірно жирні спирти і кислоти).

Слід зазначити, що нам не вдалося віднайти літературні дані, які б свідчили про здатність бактерій роду *Acinetobacter* синтезувати низькомолекулярні ліпіди з поверхнево-активними властивостями. Більшість представників роду *Acinetobacter* продукують високомолекулярні біосурфактанти, яким притаманні емульгуювальні, але не поверхнево-активні властивості [13, 16, 17]. Найдослідженішими на теперішній час є емульсан (продуцент *A. calcoaceticus* RAG-1 [6], нова назва – *A. venetianus* RAG-1 [3], *A. calcoaceticus* BD4 [9]), алазан (продуцент *A. radioresistens* K53 і KA53 [11]), дисперсан (продуцент *A. calcoaceticus* A2 [14]). За хімічною природою ці біосурфактанти є комплексом позаклітинних полісахаридів і білків.

У своїх дослідженнях з метою встановлення можливої ролі нафтоокиснювальних бактерій *A. calcoaceticus* K-4 і синтезованих ними поверхнево-активних речовин у деструкції нафтових забруднень ми використовували препарати ПАР у вигляді нативної культуральної рідини і попередньо простерилізованого супернатанту культуральної рідини.

Наші експерименти показали, що за присутності досліджуваних препаратів поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* K-4 активна деструкція нафти спостерігалась уже через сім діб (рис. 1). У цей період здійснили повторну обробку деяких модельних водойм препаратами ПАР.

Надалі у всіх варіантах спостерігали швидку деградацію нафти: нафтова плівка втратила маслянистість, перетворилася на скупчення невеликих сухих пластівців, частина яких перебувала на поверхні води, а частина після перемішування осідала на дно модельного водоймища (рис. 2).

Як видно з даних, наведених на рис. 1 і 2, біодеструкція нафти відбувалась майже однаково у всіх зразках, незалежно від того, у якому вигляді використовували ПАР (культу-

ральна рідина чи супернатант). Слід зазначити, що ми прогнозували вищу ефективність очищення води від нафти у разі застосування культуральної рідини.

Упродовж наступних 10 діб експерименту (з 20 по 30 добу) видимих змін на поверхні модельних водойм не спостерігали. Дані щодо кількісного визначення залишкової нафти на 30 добу експерименту наведено у табл. 1. Через три тижні ступінь деградації нафти становила 81–95 % (табл. 1). Слід зазначити, що ефективність розкладання нафти практично не залежала від концентрації препаратів ПАР і була достатньо високою (понад 83–85 %) навіть за одноразової обробки ними води. Не виявлено суттєвої різниці у здатності інтенсифікувати процеси деструкції нафти між препаратами у вигляді культуральної рідини і супернатанту.

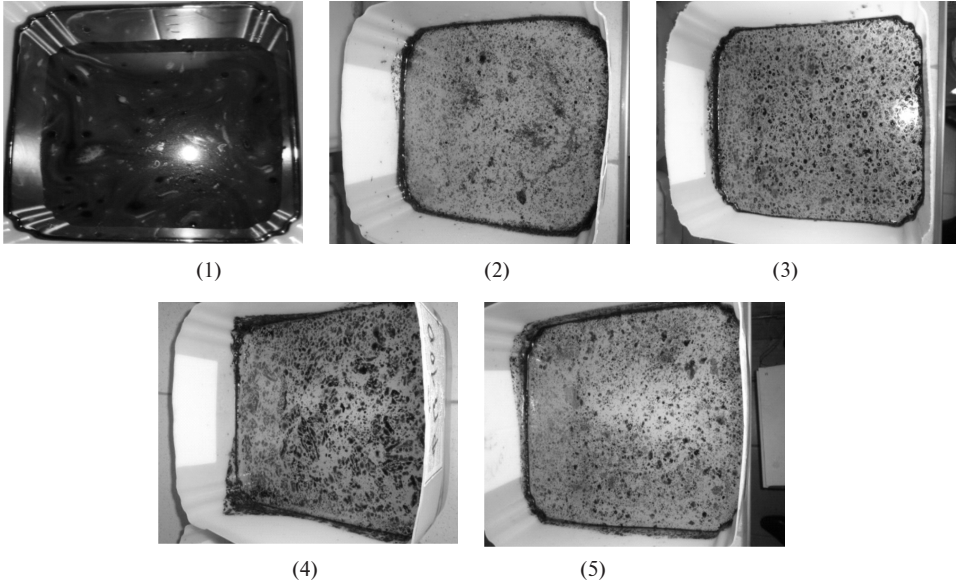


Рис. 1. Ефективність деградації нафти через 7 діб за присутності поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4:

(1) – контроль; (2) і (3) – 5 і 15 % культуральної рідини;
(4) і (5) – 15 і 5 % супернатанту відповідно.

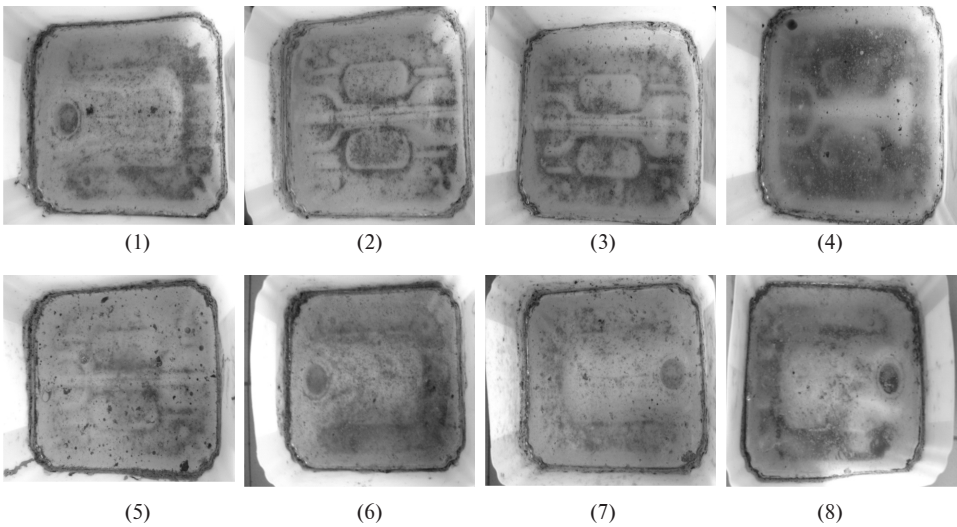


Рис. 2. Ступінь деструкції нафти за присутності препаратів ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 через 20 діб.

Кінцева концентрація препаратів ПАР (%): у вигляді культуральної рідини:
(1) – 5; (2) – 10; (3) – 15; (4) – 30;
у вигляді супернатанту: (5) – 5; (6) – 10; (7) – 15; (8) – 30.

Показники очищення води від нафти препаратами поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4

Препарат ПАР	Концентрація препарату ПАР, %	Кількість процедур обробки	Концентрація залишкової нафти, г/л	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	5	Одна	0,20±0,01	92,3±2,6
	10	Дві	0,32±0,015	87,7±2,3
	15	Одна	0,36±0,018	88,2±2,3
	30	Дві	0,28±0,014	89,2±2,4
Супернатант культуральної рідини	5	Одна	0,44±0,022	83,1±2,1
	10	Дві	0,32±0,015	85,7±2,3
	15	Одна	0,38±0,019	85,4±2,2
	30	Дві	0,32±0,015	87,7±2,2
Без обробки (контроль)			2,6	0

Одержані результати можуть свідчити про те, що основним механізмом, який зумовлює активну деструкцію нафти за присутності ПАР *A. calcoaceticus* K-4, є активація ними природної нафтоокиснювальної мікрофлори води та нафти. Для перевірки цього припущення аналізували кількісні зміни у складі мікрофлори води упродовж експерименту.

Встановлено, що у воді (до забруднення її нафтою і обробки препаратами ПАР) містилося близько $3,6 \times 10^4$ КУО/мл (табл. 2). Мікрофлора такої води була представлена чотирма морфотипами колоній: №1 – яскраво жовтого (оранжевого) кольору, круглі, опуклі, слизові, блискучі, з рівними краями, діаметр 2 мм; №2 – жовтуватого кольору, круглі, опуклі, слизові, блискучі, з рівними краями, діаметр 3 мм; №3 – округлі, прозоро-білі, опуклі з рівними краями, діаметр 1–2 мм; №4 – світло-жовтого кольору, в центрі яскравіше забарвлення, опуклі, слизові, прозорі, з рівними краями, діаметр 3–4 мм. Через 30 діб у воді було виявлено три морфотипи (№ 2–4). Загальна кількість такої мікрофлори води за цей час збільшилась на один–два порядки у різних дослідних варіантах.

Кількість виявленої через місяць сторонньої мікрофлори у воді (найімовірніше, це мікрофлора нафти і, можливо, повітря) становила від 9×10^5 до 7×10^6 клітин/мл. Така мікрофлора була представлена п'ятьма морфотипами колоній. Цікаво зазначити, що на 30 добу у жодному варіанті із застосуванням препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини нам не вдалося виявити клітини *A. calcoaceticus* K-4.

Ці результати свідчать, що одним із механізмів, що зумовлюють інтенсифікацію деградації нафти за присутності ПАР *A. calcoaceticus* K-4, є активізація природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Одержані результати показують перспективність використання препаратів ПАР, синтезованих штамом *A. calcoaceticus* K-4, для очищення води від високих концентрацій нафти. Суттєвою перевагою таких препаратів є можливість їх застосування у вигляді постферментаційної культуральної рідини, а також висока ефективність очищення від нафти за низької концентрації поверхнево-активних речовин.

Таблиця 2

Кількісна зміна мікрофлори забруднених нафтою модельних водойм через 30 діб після обробки препаратами ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* K-4

Препарат ПАР	Кінцева концентрація препарату ПАР, %	Мікрофлора води, КУО/мл	Стороння мікрофлора, КУО/мл	Загальна кількість клітин, КУО/мл
Культуральна рідина	5	$(6,2 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$	$(7,3 \pm 0,4) \times 10^6$
	10	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^6$
	15	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^6$
	30	$(5,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^6$
Супернатант культуральної рідини	5	$(6,0 \pm 0,3) \times 10^5$	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$
	10	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^6$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^6$
	15	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(6,0 \pm 0,3) \times 10^5$	$(9,0 \pm 0,5) \times 10^5$
	30	$(4,0 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^6$
Вода до обробки (контроль)		$(3,6 \pm 0,2) \times 10^4$	-	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^4$

Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *A. calcoaceticus* K-4, інтенсифікують процеси деструкції нафти в результаті стимуляції природної нафтоокиснювальної мікрофлори. Показана можливість використання для ефективного (деградація на 80–95 % нафти у концентрації 2,6 г/л) очищення води невисоких концентрацій препаратів ПАР у вигляді культуральної рідини (5 %).

Т.П. Пирог, С.И. Антонюк, А.И. Сорокина

Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01033, Украина

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБНОЙ ДЕСТРУКЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Показана возможность использования препаратов поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтезированных *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, для очистки воды от нефти. Через 30 суток степень деградации нефти (2,6 г/л) в присутствии 5–30 % (по объему) препаратов ПАВ в виде постферментационной культуральной жидкости или ее супернатанта составляла 81–95 %. Интенсификация деструкции нефти обусловлена активацией природной нефтеокисляющей микрофлоры под влиянием поверхностно-активных веществ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, деструкция нефти, очистка воды, активация нефтеокисляющей микрофлоры.

T.P.Pirog, S.I. Antonyuk, A.I. Sorokina

National University of Food Technologies

THE INFLUENCE OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* K-4 SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES ON THE EFFICIENCY OF MICROBIAL DESTRUCTION OF OIL POLLUTANTS

Summary

The possibility of the use of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 surface-active substances (SAS) for water purification from oil was shown. The efficiency of oil degradation (2.6 g/l) in the presence of SAS preparations (5–15 %) in the form of postfermentation of cultural liquid or its supernatant was established to be 81–95 %. Intensification of oil destruction was determined by SAS affecting the activity of oil-oxidizing microbial population.

Key words: surface-active substances, degradation of oil, purification of water, activation of oil-oxidizing microbial population.

The author's address: *T.P. Pirog*, National University of Food Technologies; 68 Vladimirska St., Kyiv, 01033, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – № 1. – С. 58–63.
2. Пирог Т.П., Антонюк С.И. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Наукові праці НУХТ. – 2007. – № 22. – С. 50–53.
3. Bach H., Berdichevsky Y., Gutnick D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69, N 5. – P. 2608–2615.
4. Bodour A.A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B.V., Malcomson M.E. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11 // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70, N 1. – P. 114–120.
5. Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // J. Appl. Microbiol. – 2002. – 93, N 6. – P. 915–929.
6. Gutnick D.L., Bayer E.A., Rubinovitz C., Pines O., Shabtai Y., Rosenberg E. Emulsan production in *Acinetobacter* RAG-1 // Adv. Biotechnol. – 1980. – 11. – P. 455–459.
7. Hua Z., Chen J., Lun S., Wang X. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. // Water Res. – 2003. – 37, N 17. – P. 4143–4150.

8. Kaplan N., Zosim Z., Rosenberg E. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by with pure polysaccharide and protein // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – **53**, N 2. – P. 440–446.
9. Lu X.X., Zhang X., Li G.H., Zhang W.H. Production of biosurfactant and its role in the biodegradation of oil hydrocarbons // J. Environ. Sci. Health Part A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. – 2003. – **38**, N 3. – P. 483–492.
10. Navon-Venezia S., Zosim Z., Gottlieb A., Legmann R., Carmeli S., Ron E.Z., Rosenberg E. Alasan, a new bio-emulsifier from *Acinetobacter radioresistens* // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – **61**, N 9. – P. 3240–3244.
11. Ron E.Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // Curr. Opin. Biotechnol. – 2002. – **13**, N 3. – P. 249–252.
12. Rosenberg E., Rubinovitz C., Gottlieb A., Rosenhak S., Ron E.Z. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2 // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – **54**, № 2. – P. 317–322.
13. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – **52**, N 2. – P. 154–162.
14. Shulga A., Karpenko E., Vildanova-Martishin R.I., Turovsky A.A., Soltys M. Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments // Adsorp. Sci. Technol. – 2000. – **18**, N 2. – P. 171 – 176.
15. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rozenberg E. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, N 3. – P. 1102–1106.
16. Walzer G., Rozenberg E., Ron E.Z. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier // Environ. Microbiol. – 2006. – **8**, N 6. – P. 1026–1032.
17. Wouter H. Noordman, Dick B. Janssen. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. Rev. – 2002. – **68**, N 9. – P. 4502 – 4508.