

Думанська Т. У., Карпенко О. В., Ногіна Т. М.,
Вільданова-Марцишин Р. І., Підгорський В. С.

ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*, *GORDONIA RUBROPERTINCTUS* ТА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*

Досліджено здатність до синтезу поверхнево-активних речовин і склад позаклітинних ліпідів штамів *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012, *Gordonia rubropertinctus* IMB Ac-5005 та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013 — мікробного компоненту препарату «Родойл». Встановлено, щороодококи та гордонії утворюють стійкі емульсії типу «олія у воді», а ацинетобактер — нестійку емульсію «вода у олії». При рості на середовищі з гексадеканом у досліджених штамів виявлено досить високі, але менші, ніж на етанолі, значення поверхневого натягу (ПН) супернатанту культуральної рідини (45,0 мН/м — 54,8 мН/м). Більш низькі значення ПН були виявлені у екстрактів позаклітинних ліпідів вказаних культур: 41,1 мН/м (для родококів), 34,1 мН/м (для гордоній) та 42,0 мН/м (для ацинетобактера).

Бактерії родів *Gordonia*, *Rhodococcus* і *Acinetobacter* належать до активних деструкторів вуглеводнів нафти і широко використовуються в біотехнологіях відновлення забрудненого цими речовинами навколишнього середовища [1]. Відомо, що у процесах засвоєння вуглеводнів беруть участь ліпіди клітинних стінок мікроорганізмів, біодеструктивна активність яких в значній мірі залежить від здатності поглинати цей гідрофобний субстрат [2-4]. Показано, зокрема, що у представників родів *Gordonia* і

Rhodococcus до таких ліпідів належать міколові кислоти (як вільні так і ковалентно зв'язані з арабіногалактаном), які локалізовані в клітинній стінці і утворюють разом із нековалентно зв'язаними міколатами трегалози основу зовнішнього ліпідного бар'єру проникності гідрофобного субстрату у клітину [5]. Основні гліколіпідні компоненти клітинних стінок цих бактерій (трегалономономіколати та трегалозодиміколати) проявляють поверхнево активні властивості і здатні емульгувати вуглеводні [6].

Вказані речовини зменшують міжфазний натяг на межі розподілу фаз вода - вуглеводні, збільшуючи тим самим площу поверхні нерозчинного субстрату, що сприяє підвищенню його біодоступності [7]. Дані у літературі свідчать про те, що мікроорганізми здатні утворювати як зв'язані з клітинною, так і позаклітинні поверхнево активні речовини (біоПАР), найбільш розповсюдженим з яких є гліколіпіди [6].

Попередні наші дослідження були присвячені в основному вивченню залежності гідрофобно-гідрофільного балансу клітинної поверхні вуглеводеньокислюючих штамів *R.erythropolis* IMB B-7012, *G.rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *A.calcoaceticus* IMB B-7013 від фази розвитку культур та природи вуглецевого субстрату [8]. Метою цієї роботи є визначення здатності до синтезу біоПАР, а також кількісного та якісного складу ліпідів штамів *R.erythropolis* IMB B-7012, *G.rubropertinctus* IMB Ac-5005 та *A.calcoaceticus* IMB B-7013 при рості на гідрофільному (етанол) і гідрофобному (гексадекан) субстратах.

Матеріали та методи дослідження

Використані у роботі штами *R.erythropolis* IMB B-7012, *G.rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *A.calcoaceticus* IMB B-7013 належать до мікробного компоненту препарату «Родойл», призначеного для очищення довкілля від нафти та нафтопродуктів [9]. Кількість залишкових вуглеводнів аналізували методом ІЧ-фотометрії, як описано в роботі [9]. Біомасу визначали ваговим методом. Для вивчення здатності штамів до росту безпосередньо в шарі вуглеводнів як середовище використовували 100 % дизельне паливо, до якого додавали 0,1 % нітроамофоски, що слугувала джерелом азоту, фосфору та калію. Інокулятом була суспензія клітин (із титром 10^8 КУО/мл) штамів *Rerythropolis*, *G. rubripertinctus* і *A. calcoaceticus* у співвідношенні 1:1:1. Культивування проводили в пробірках на качалках (180об/хв) упродовж 14 діб. Дослідження ліпідів, поверхневого натягу та емульгуючої активності проводили на початку стаціонарної фази розвитку культур, вирощених у колбах на качалках (240 об/хв) при температурі 28 °С на середовищі Гудвіна [10], яке містило 2 % етанолу або гексадекану. Поверхневий натяг (ПН) культуральної рідини (КР), супернатантів культуральної рідини (СКР) та суспензії клітин визначали методом Ребіндера з використанням платинової пластинки Вільгельмі [11]. Показник гідрофобності клітин та емульгуючу активність визначали, як описано нами раніше [8]. Визначення індексу емульгування (E_{24}) зразків проводили через 24 год і представляли у відсотках як

відношення висоти емульгованого шару до загальної висоти рідини у пробірці. Кількісний та якісний склад ліпідних компонентів визначали, як описано в роботі Шульги із співавторами [12]. Досліди виконували в незалежних 4-5 повторях, середні значення яких представлено в роботі.

Результати дослідження

Встановлено, що всі штами проявляють високу деструктивну активність щодо гексадекану, рівень якої досягав у *R.erythropolis* IMB B-7012 значення 96,9 %, у *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 - 98,3 % та у *A.calcoaceticus* IMB B-7013 - 96,6 %. При засвоєнні цього субстрату вказані штами накопичували в 2,4-2,6 разів більшу, ніж на етанолі, біомасу, яка складала 5,7 г/л у *R.erythropolis*; 8,9 г/л у *G.rubropertinctus* та 3,7 г/л у *A. calcoaceticus*. Показано, що досліджені штами відрізнялись за характером росту в рідкому середовищі при засвоєнні гідрофобного (гексадекан) та гідрофільного (етанол) субстратів. КР всіх штамів при рості на етанолі, а для *A. calcoaceticus* - і на гексадекані, являла собою гомогенну суспензію клітин. На відміну від цього, у штаму *R. erythropolis* ріст на гексадекані супроводжувався утворенням у КР гомогенної суспензії клітин і формуванням у ній конгломератів клітин у вигляді пастоподібних за своєю консистенцією кульок, які складали значну частину біомаси вказаного штаму. Подібне явище описано і для деяких інших представників цього виду. У штаму *G. rubripertinctus* на гексадекані також утворювались конгломерати клітин, але в значно меншій, ніж у *R. erythropolis*, кількості.

Відомо, що завдяки специфічності будови клітинної стінки родококів і гортоній, яка має багатшарову структуру та високий вміст ліпідів, ці мікроорганізми можуть проникати безпосередньо в нафтову плівку, поглинати вуглеводні всією поверхнею клітин та акумулювати цей субстрат в клітинах. Проведене нами дослідження здатності штамів *R.erythropolis*, *G.rubropertinctus* та *A.calcoaceticus* рости в 100 % дизельному паливі показало, що в цих умовах зберіг життєздатність і накопичував біомасу тільки штам *R erythropolis*, титр клітин якого збільшився протягом 14 діб з початкового $1,0 \times 10^6$ КУО/мл до $1,0 \times 10^8$ КУО/мл.

Як вже зазначалося вище, одним із факторів адаптації мікроорганізмів, зокрема бактерій родів *Gordonia* і *Rhodococcus*, до засвоєння гідрофобних субстратів є синтез біоПАР, які проявляють емульгуючу активність. Тому визначення індексу емульгування часто використовують як нескладний тест для первинної оцінки здатності культур до утворення біоПАР. Враховуючи наведене, ми дослідили емульгуючу ак-

тивність КР, СКР та суспензії клітин досліджуваних штамів. Виявлено, що вивчені бактерії утворюють емульсії різних типів і стабільності: штами *R. erythropolis* та *G. rubropertinctus* формують стабільні емульсії типу - «оля у воді», а *A. calcoaceticus* - нестабільну емульсію «вода у олії», яка руйнувалась протягом першої години спостережень. Показано, що індекс емульгування родококів та гордоній при рості на гексадекані був найвищим у суспензії клітин, і на початку стаціонарної фази росту досягав максимальних значень $E_{24} = 47,0\%$ у штаму *Rerythropolis* та $E_{24} = 42,0\%$ - у *G.rubropertinctus* (табл.). Це відповідало і найвищим значенням показника гідрофобності для вказаних штамів, який дорівнював $58,0\%$ у *R.erythropolis* та $31,0\%$ - у *G.rubropertinctus*. На відміну від суспензії клітин та КР, індекс емульгування СКР штамів *Rerythropolis* та *G.rubropertinctus* був незначним і дорівнював лише $E_{24} = 4,0-5,0\%$. Подібна тенденція спостерігалась при рості вказаних штамів і на етанолі, але кількісні значення E_{24} були набагато нижчими (табл.). Зниження емульгуючої активності КР штамів *Rerythropolis* та *G.rubropertinctus* після вилучення з неї клітин може свідчити про те, що синтезовані дослідженими штамми емульгатори асоційовані з клітинами. Встановлено, що штам *A.calcoaceticus* характеризується дуже низькими показниками E_{24} , які були вищими при рості на гексадекані та етанолі у суспензії клітин ($E_{24} = 7,0-9,0\%$), ніж у КР та СКР (табл.). Наведені результати підтверджують отримані нами раніше дані [8] про те, що для дослідженого штаму *A.calcoaceticus* не властиво утворення емульгаторів, які можуть стабілізувати водно-вуглеводневі емульсії.

Вивчення здатності досліджених штамів до синтезу позаклітинних біоПАР показало, що для СКР штамів *Rerythropolis* і *G.rubropertinctus* характерні досить високі значення ПН, які на початку стаціонарної фази росту культур становили для родококів $57,6$ мН/м (на етанолі) та $49,6$ мН/м (на гексадекані), а для гордоній - $62,4$ мН/м (на етанолі) та $45,9$ мН/м (на гексадекані) (табл.). У штаму *A. calcoaceticus* ПН для СКР при рості на гексадекані та етанолі був також високим і дорівнював $54,8$ мН/м та $53,9$ мН/м відповідно.

Враховуючи те, що значна кількість біоПАР, які синтезуються вуглеводеньокислюючими мікроорганізмами, в першу чергу представниками родів *Rhodococcus* та *Gordonia*, містять у своєму складі ліпідні компоненти, а також те, що процес регуляції синтезу вказаних речовин здійснюється у них перш за все на рівні синтезу ліпідів клітинної стінки, ми провели вивчення у досліджених штамів кількісного та якісного складу клітинних і позаклітинних ліпідів (ПЛ) та визначили

їхні поверхнево-активні властивості. Встановлено, що при культивуванні на гексадекані у всіх штамів синтезується більша, порівняно з етанолом, кількість ліпідів, що узгоджується із наявними у літературі даними [13]. Так, зокрема, при рості на гексадекані кількість ПЛ в СКР на початку стаціонарної фази розвитку культур була в 2-3 рази більшою, ніж на етанолі і дорівнювала у *Rerythropolis*, *G.rubripertinctus* та *A.calcoaceticus* $0,35$ г/л, $0,37$ г/л та $0,20$ г/л відповідно (рис. 1). Для фракцій ПЛ, які екстраговані із СКР цих бактерій при рості на гексадекані, зафіксовано більш низький, порівняно з СКР, поверхневий натяг, що дорівнював у *R.erythropolis* $41,1$ мН/м, у *G.rubropertinctus* - $34,1$ мН/м та у *A.calcoaceticus* - $42,1$ мН/м (табл.).

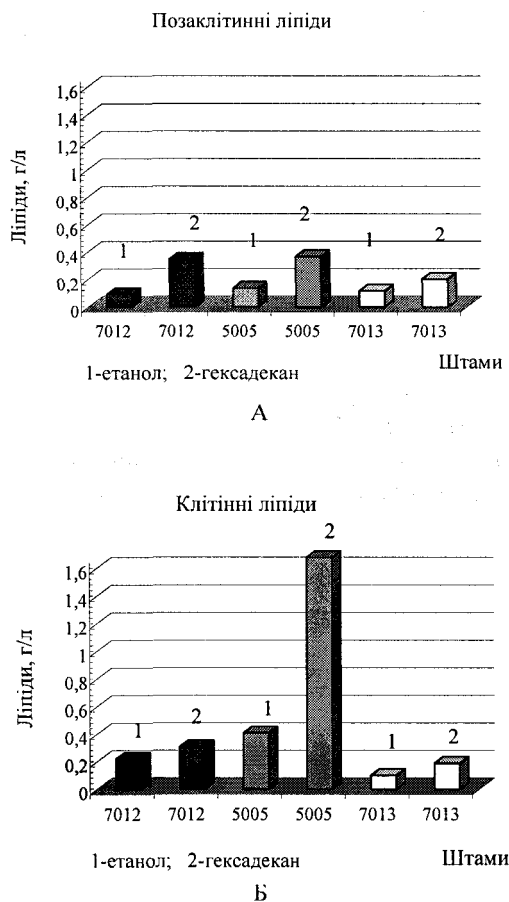


Рис. 1. Синтез позаклітинних (А) та клітинних (Б) ліпідів штамми *R.erythropolis* IMB B-7012, *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *A. calcoaceticus* IMB B-7013

Дослідження складу позаклітинних полярних і неполярних ліпідів штамів *R.erythropolis* і *G.rubropertinctus* показало, що у них переважають фракції гліколіпідів, які ідентифіковані як трегалозомономіколат та трегалозодиміколат (рис. 2). Серед неполярних ліпідів виявлено міколові кислоти, цетиловий спирт та ефіри жир-

них кислот. Встановлено, що при засвоєнні гексадекану ПЛ штаму *R. erythropolis* містять також пептидогліколіпіди, які поряд із гліколіпідами є специфічними компонентами клітинних стінок цих бактерій і визначають їхні поверхнево-активні властивості.

Таблиця. Поверхневі властивості штамів *R. erythropolis* IMB B-7012, *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 та *A. calcoaceticus* IMB B-7013 при рості на етанолі (2 %) та гексадекані (2 %)

Субстрат	ПН, мН/м		Індекс емульгування (ЕІ. %)			Гідро-фоб-ність, %
	позаклітинні ліпіди	супернатант	культуральна рідина	супернатант	суспензія клітин	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 1МВ В—7012						
Етанол	н/д	57,65	23,0	3,5	39,0	31,0
Гексадекан	41,1	49,6	35,0	5,0	47,0	58,0
<i>Gordonia rubropertinctus</i> 1МВ Ас—5005						
Етанол	н/д	62,37	21,0	2,5	35,0	15,0
Гексадекан	34,1	45,9	31,0	4,0	42,0	31,0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 1МВ В-7013						
Етанол	н/д	53,9	4,0	2,0	7,0	60,0
Гексадекан	42,1	54,8	6,0	3,5	9,0	68,0

Таким чином, нами охарактеризовано поверхнево-активні властивості мікробного компонента препарату «Родойл». Встановлено, що штами *R.erythropolis* IMB B-7012 і *G.rubropertinctus* IMB Ac-5005, яким властива досить низька гідрофобність клітинної поверхні, синтезують асоційовані з клітинами біоПАР. Вказані біоПАР містять у своєму складі ліпіди, зокрема трегало-

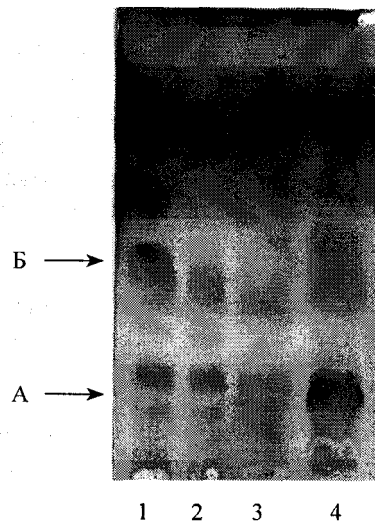


Рис. 2. Тонкошарова хроматографія клітинних та позаклітинних ліпідів штаму *R. erythropolis* IMB B-7012 при рості на гексадекані. Клітинні (1, 2) та позаклітинні ліпіди (3 - культивування 5 діб; 4 - культивування 7 діб). Полярна рухома фаза; А - трегалозомономіколат; Б - трегалозодиміколат

зомоно- та трегалозодиміколата, і здатні утворювати стабільні емульсії. Наявність вказаних речовин у культуральному середовищі може бути результатом відокремлення деяких поверхневих фрагментів клітинної стінки цих бактерій і/або їх частковою екстракцією вуглеводневим субстратом. Позаклітинні ліпіди штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7013, який має високогідрофобну поверхню клітин, також здатні знижувати ПН культуральної рідини, але, на відміну від *R.erythropolis* і *G.rubropertinctus*, вказані речовини не здатні стабілізувати водно-вуглеводневі емульсії.

1. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 1996. - Т. 32. - № 6. - С. 579-585.
2. Bredholt H., Bruheim P., Potocky M., Eimhjellen K. Hydrophobicity development, alkane oxidation, and crude-oil emulsification in a *Rhodococcus species* II Can. J. Microbiol. - 2002. - V. 48. - № 2. - P. 295-304.
3. Корнелли Т. В. Поступление углеводородов в клетки микроорганизмов. - Успехи микробиологии. - 1980. - № 15. - С. 99-111.
4. Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора биологических наук. - Пермь, 1997. - 98 с.
5. Sokolovska I., Rozenberg R., Rie C., Rouxhet P., Agathos S., Wattiau P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* El II Appl. Envir. Microbiol. - 2003. - V. 69. - № 12. - P. 7019-7027.
6. Haferburg D., Hommel R., Claus R., Kleber H.-P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants II Adv. in Biochemical Engineering I Biotechnology. - Berlin; New York; Tokyo, 1986. - V. 33. - P. 53-93.
7. Lang S., Philp J. Surface-active lipids in *Rhodococcus* II Antonie van Leeuwenhoek. - 1998. - V. 74. - № 1. - P. 59 - 70.
8. Ногіна Т. М., Думанська Т. У., Підгорський В. С. Гідрофобно-гідрофільні та емульгуючі властивості клітин *Rhodococcus erythropolis*, *Gordonia rubropertinctus* та *Acinetobacter calcoaceticus* при рості на різних субстратах // «Наукові записки НаУКМА». - 2003. - Т. 21. - С. 15-19.
9. Ногіна Т. М., Підгорський В. С., Дульгерев О. М., Думанська Т. У. Новий комплексний біопрепарат для очищення ґрунту і води від забруднень нафтою та нафтопродуктами // Вісник Одеського національного університету. - 2001. - Т. 6. - № 4. - С. 224-227.
10. Донец А. Т., Кошелев В. В., Бехтерева М. Н. Качественное и количественное содержание липидов у бактерий // Микробиология. - 1970. - Т. 24. - № 2. - С. 300-304.
11. Абрамзон А. А., Зайченко Л. П., Райнгольд С. И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, применение. - Л.: Химия, 1988. - 200 с.
12. Шульга А. Н., Карпенко Е. В., Елисеев С. А., Туровский А. А., Коронелли Т. В. Внеклеточные липиды и поверхностно-активные свойства бактерии *Rhodococcus erythropolis* в зависимости от источника углеродного питания // Микробиология. - 1990. - Т. 59. - № 3. - С. 443-447.
13. Коронелли Т. В., Комарова Т. И., Поршнев О. В., Дермичева С. Г. Изменение липидного состава клеток S- и R- вариантов *Rhodococcus erythropolis* при длительном хранении на лабораторной среде // Микробиология. - 1998. - Т. 67. - в. 5. - С. 718-720

T. Dumanska, O. Karpenko, T. Nogina, R. Vildanova-Marchishin, V. Podgorsky

**SURFACE-ACTIVE PROPERTIES OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*,
GORDONIA RUBROPERTINCTUS AND *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*
STRAINS**

*The ability to produce surfactants and the composition of extracellular lipids of strains *Rhodococcus erythropolis* 1MB B-7012, *Gordonia rubropertinctus* 1MB Ac-5005 and *Acinetobacter calcoaceticus* 1MB B-7013 - microbial components of preparation "Rodoil"-was studied. It is shown that culture broth of rhodococci and gordonia forms stable emulsions of the type «oil in water», and acinetobacter forms unstable emulsion "water in oil". High values of surface tension (ST) of supernatants culture broth (45,0 mN/m - 54,8 mN/m) were observed during growth of investigated strains on hexadecane, but less than on ethanol. More low values ST are revealed for the extracellular lipids extracts of mentioned cultures: 41,1 mN/m (for rhodococcus), 34,1 mN/m (for gordonia) and 42,0 mN/m (for acinetobacter).*