

Ногіна Т. М., Думанська Т. У., Підгорський В. С.

ГІДРОФОБНО-ГІДРОФІЛЬНІ ТА ЕМУЛЬГУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*, *GORDONIA* *RUBROPERTINCTUS* ТА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ПРИ РОСТІ НА РІЗНИХ СУБСТРАТАХ

Досліджено гідрофобно-гідрофільні та емульгуючі властивості вуглеводеньокислюючих штамів *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012, *Gordonia rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013. Установлено, що вказані штами відрізняються за показником гідрофобності (ПГ) клітинної поверхні, який має вищі значення при рості культур на гідрофобному (гексадекан), ніж на гідрофільному (етанол) субстраті. Найбільшу гідрофобність (ПГ = 99,4–59,6 %) виявлено у штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7013. Для *R. erythropolis* IMB B-7012 залежно від субстрату та фази росту культур ПГ становив 2,4–58,0 %, а для *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 – 9,6–31,0 %. Штам *R. erythropolis* IMB B-7012 проявляв емульгуючу активність при рості на обох субстратах, а *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 – тільки на гексадекані. У штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7013 емульгуючої активності не виявлено.

Фізико-хімічні властивості клітинної поверхні є важливим екологічним фактором, що визначає характер взаємодії мікробної клітини з її мікроосередком. Гідрофобність як одна з основних характеристик поверхні клітин лежить в основі таких процесів, як адсорбція мікроорганізмів на твердих поверхнях, прикріплення їх до тканин організму-хазяїна, утворення біоплівки, засвоєння водонерозчинних субстратів, зокрема вуглеводнів нафти [1–3]. У зв'язку з тим що ферменти, які окислюють вуглеводні, локалізовані в цитоплазматичній мембрані, активність їх утилізації значною мірою залежить від здатності

клітин поглинати цей гідрофобний субстрат [2–5]. Мікроорганізми, що засвоюють вуглеводні, вирішують цю проблему різними шляхами, зокрема формуванням гідрофобної клітинної стінки, утворенням у гідрофільній клітинній стінці ліпофільних каналів, продукуванням позаклітинних сурфактантних комплексів, які мають емульгуючі властивості [2, 4, 6]. Незважаючи на те що бактерії родів *Rhodococcus*, *Gordonia* та *Acinetobacter* належать до активних деструкторів вуглеводнів нафти й широко використовуються для очищення довкілля від цих ксенобіотиків, фізико-хімічні характеристики клі-

тинної поверхні в них досліджено недостатньо.

Метою даної роботи було вивчення гідрофобно-гідрофільних та емульгуючих властивостей вуглеводеньокислюючих штамів *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012, *Gordonia rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013, що утворюють мікробний компонент препарату «Родойл», який призначений для рекультивациі нафтозабруднених середовищ.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використано штами *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012, *Gordonia rubropertinctus* IMB Ac-5005 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013, які депоновані в Інституті мікробіології і вірусології НАН України і входять до складу нафтоокислюючого препарату «Родойл» [7]. Бактерії вирощували протягом 5 діб у періодичних умовах у колбах на качалках (180 об./хв)

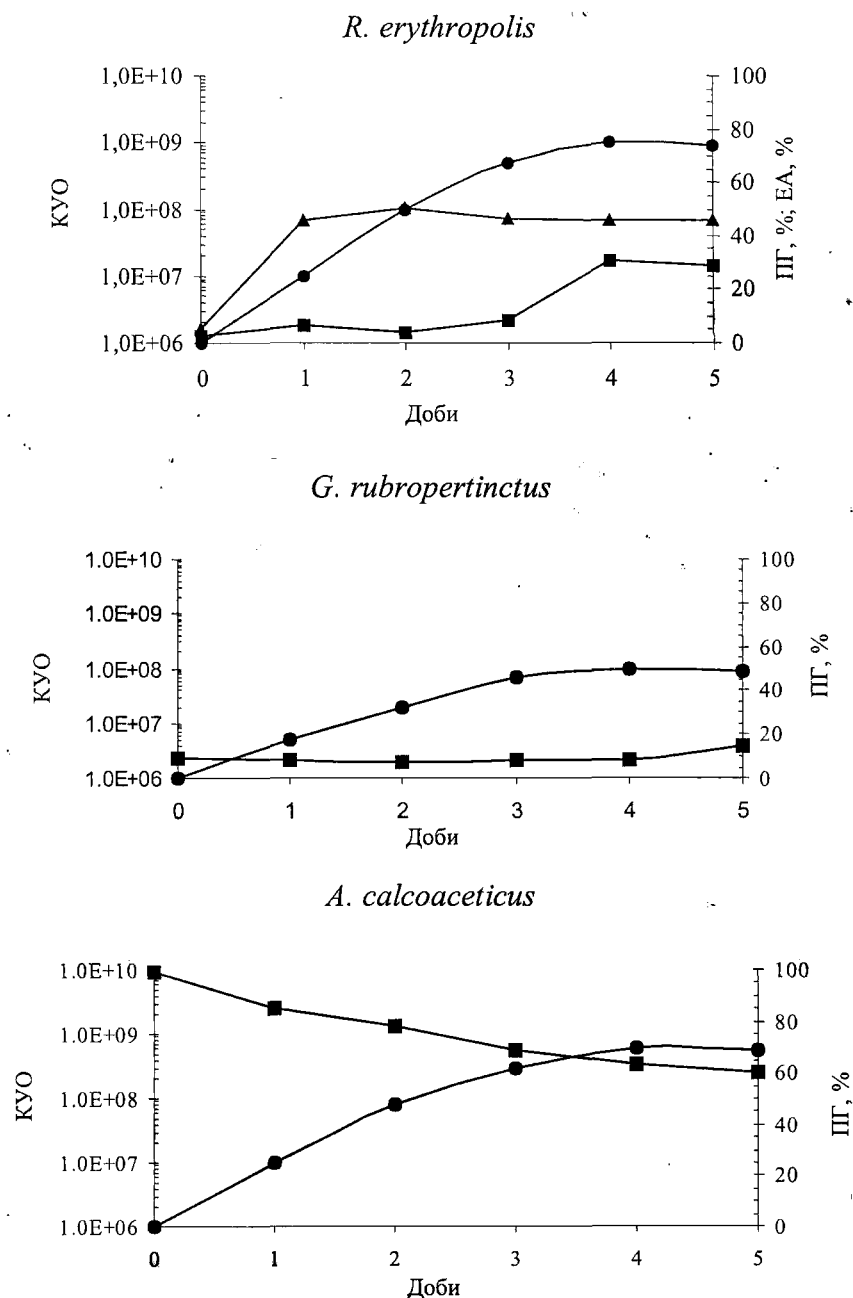


Рис. 1. Зміна гідрофобності та емульгуючої активності бактеріальних культур при рості на етанолі

● – КУО – колонієутворююча одиниця в 1 мл, ■ – ПГ – показник гідрофобності, ▲ – ЕА – емульгуюча активність

при температурі 28 °С на середовищі Мюнца [8] із внесенням 0,5 %-го етанолу або гексадекану як єдиного джерела вуглецю та енергії. Кількість клітин визначали за числом колонієутворюючих одиниць (КУО) методом висіву серійних розведень відповідних культур на м'ясо-пептонний агар (МПА).

Вивчення гідрофобності клітинної поверхні проводили за описаним Розенбергом та іншими дослідниками методом [9], який ґрунтується на здатності клітин до адгезії на вуглеводнях (н-гексадекану). Показник гідрофобності (ПГ, %) поверхні клітин розраховували за формулою: $ПГ = [1 - (D / D_0)] \cdot 100 \%$, де: D_0 – оптична густина (ОГ) початкової бактеріальної суспензії до

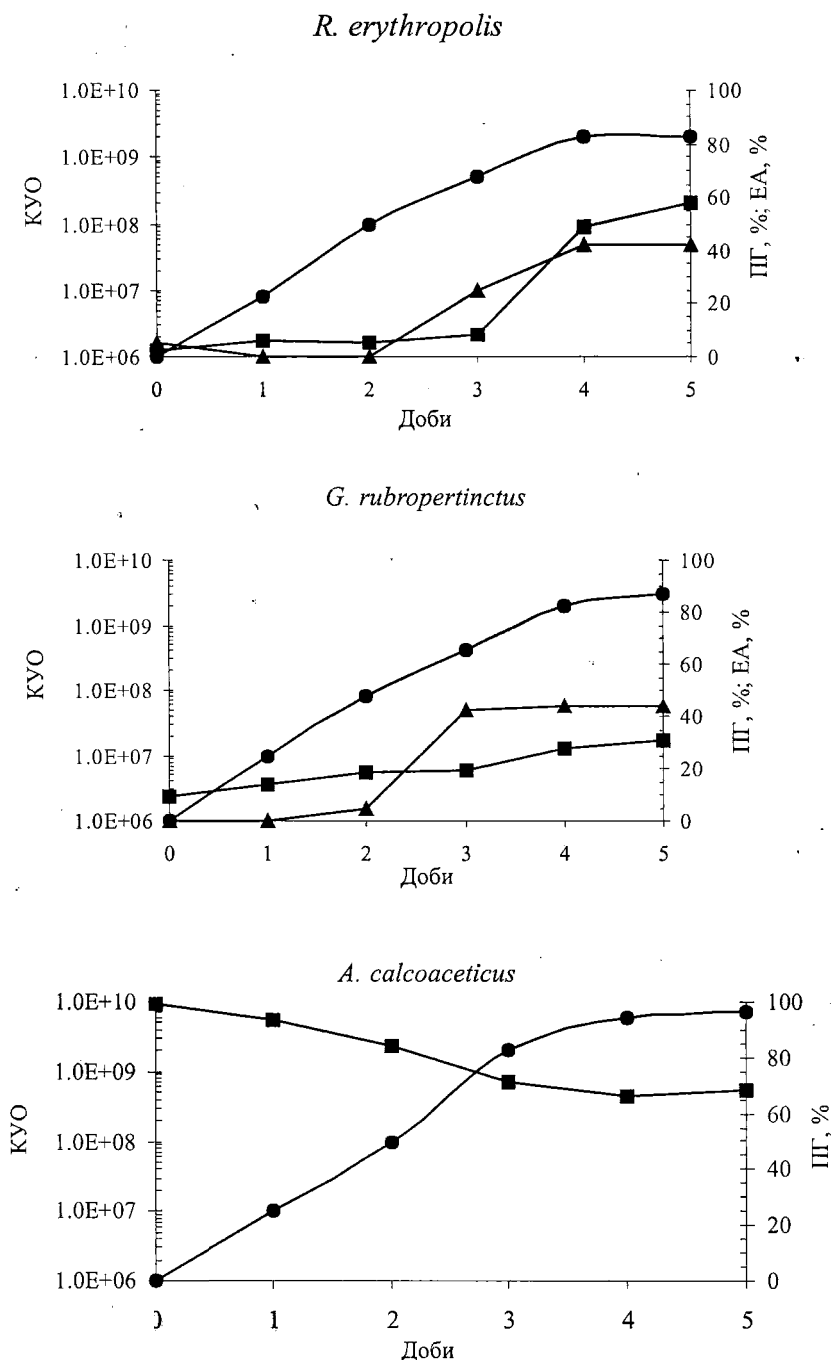


Рис. 2. Зміна гідрофобності та емульгуючої активності бактеріальних культур при рості на гексадекані

● – КУО – колонієутворююча одиниця в 1 мл, ■ – ПГ – показник гідрофобності, ▲ – ЕА – емульгуюча активність

обробки вуглеводнем, яка була постійною в усіх дослідах і дорівнювала 0,5 одиниці ОГ; D – оптична густина бактеріальної суспензії, що залишилась у водній фазі після взаємодії клітин із вуглеводнем. ОГ суспензій вимірювали на ФЕК-2КФК (довжина хвилі 540 нм, кювета з робочим кроком 1 см).

Емульгуючу активність (ЕА, %) визначали методом Купера, описаним у роботі Турковської та ін. [10]. Досліди виконували в незалежних 4–5 повторностях, середні арифметичні значення яких представлено в роботі.

Результати дослідження

Нами встановлено, що штами *R. erythropolis* IMB B-7012 та *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 характеризуються досить низьким ступенем гідрофобності клітинної поверхні при рості на МПА та етанолі: ПГ поверхні клітин *R. erythropolis* IMB B-7012 знаходилось в межах від 2,4 до 31,0 %, а *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 – від 9,6 до 15,0 % (рис. 1). При культивуванні цих штамів на гексадекані гідрофобність поверхні клітин *R. erythropolis* IMB B-7012 значно зростала, досягаючи максимальних значень ПГ 58,0 %, а в *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 підвищувалась тільки до 31,0 % (рис. 2). Таким чином, нами встановлено, що штами *R. erythropolis* IMB B-7012 та *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005, незважаючи на наявність у них ліпофільної клітинної стінки зі значним вмістом високогідрофобних молекул міколових кислот [11], характеризуються значно нижчим (особливо у *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005), ніж можна було очікувати, ступенем гідрофобності клітинної поверхні. Це може бути пов'язано із синтезом вказаними штамми позаклітинних гідрофільних метаболітів, які зменшують гідрофобні властивості клітин, або формуванням поверхневих полісахаридних капсулоподібних структур, що описано для деяких інших штамів нокардіоподібних актинобактерій, зокрема видів родококків та гордоній [6, 12, 13]. Одним із проявів достатньо високої гідрофільності поверхні клітин *R. erythropolis* IMB B-7012 та *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 може слугувати встановлений нами факт утворення цими штамми при рості на твердих середовищах тільки гладких (S) або муконічних (M) колоній, що, як показано багатьма авторами [6, 14], мають значно меншу (в 2–10 разів) порівняно з шорсткими (R) варіантами гід-

Аналіз змін ПГ у процесі культивування вказаних штамів на гексадекані показав, що у *R. erythropolis* IMB B-7012 відбувається значне (в 24 рази) збільшення цього показника із середини до кінця експоненційної фази росту, а в *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 спостерігається поступове підвищення ПГ протягом експоненційної й до початку стаціонарної фази росту (рис. 1, 2). Динаміка змін гідрофобності клітин при рості цих культур на етанолі була близькою до тих, що спостерігались на гексадекані, але абсолютні значення ПГ на етанолі, як ми вже вказували раніше, були набагато нижчими (рис. 1). Отримані нами результати узгоджуються з наведеними в літературі даними про характер залежності гідрофобності поверхні клітин родококків від фази росту культур [2].

На відміну від родококків та гордоній штам *A. calcoaceticus* IMB B-7013 характеризувався притаманною цьому виду високою гідрофобністю поверхні клітин, значення ПГ у нього при рості на спирті й гексадекані було не нижчим за 60,0 % та 68,0 % відповідно (рис. 1, 2). Максимальне значення ПГ становило 99,4 % в 48-годинних культур цього штаму після їх росту на МПА. У процесі культивування на рідких середовищах, незалежно від субстрату, ПГ ацинетобактера дещо знижувався, досягаючи найменших показників на початку стаціонарної фази росту. Високі значення ПГ клітинної поверхні *A. calcoaceticus* виявлено у представників цього виду й іншими авторами [15]. Ацинетобактери, як відомо, мають ліпофільну зовнішню мембрану й гідрофільну клітинну стінку. Висока гідрофобність поверхні клітин цих бактерій забезпечує їм міцне прикріплення до крапель вуглеводнів, збільшуючи тим самим площу контакту з цим водонерозчинним субстратом та індукцію ферментів, необхідних для його засвоєння.

Вивчення здатності штамів до синтезу позаклітинних емульгаторів показало, що *R. erythropolis* IMB B-7012 проявляє емульгуючі властивості при рості як на спирті, так і на гексадекані, причому найвища ЕА виявляється в нього наприкінці експоненційної фази росту (рис. 1, 2). Штам *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005 здатний емульгувати тільки гідрофобний субстрат (гексадекан), досягаючи найбільшої ЕА на початку стаціонарної фази росту (рис. 2); при рості на гідрофільному субстраті в цього штаму синтез емульгаторів не спостерігається. На відміну від вказаних штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7013 в умовах наших дослідів не проявляв ЕА на обох субстратах.

Таким чином, нами показано, що штами *R. erythropolis* IMB B-7012 і *G. rubropertinctus* IMB Ac-5005, які мають досить низьку початкову гідрофобність поверхні клітин, та високогідрофобний штам *A. calcoaceticus* IMB B-7013 різною мірою змінюють гідратацію клітинної поверхні залежно від фази росту та ростового субстрату, маючи вищі показники ПГ на гідрофоб-

ному субстраті. Це може бути наслідком переходу в поверхневі шари клітин гідрофобних або гідрофільних сполук, що входять до складу клітинної стінки (зокрема, полісахаридів, гліколіпідів, поліпептидів, фосфоліпідів) і/або синтезом нових речовин та позаклітинних метаболітів. Вивченню цих процесів будуть присвячені наші подальші дослідження.

1. Звягинцев Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. – М.: Изд-во МГУ, 1973. – 176 с.
2. Bredholt H., Bruheim P., Potocky M., Eimhjellen K. Hydrophobicity development, alkane oxidation, and crude-oil emulsification in a *Rhodococcus species* // Can. J. Microbiol. – 2002. – V. 48. – N 2. – P. 295–304.
3. Sylidat C., Wagner F. Production of biosurfactants. In Biosurfactants and biotechnology / Ed. by N. Kosaric, W. L. Cairns, and N.C.C. Gray. Surfactant Science Series; Marcel Dekker, New York. – 1987. – P. 89–120.
4. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 579–585.
5. 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.
6. Sunairi M., Iwabuchi N., Murooka H., Morisaki H., Nakajima M. Cell-surface hydrophobicity of *Rhodococcus rhodochrous* strains with different colonial morphologies // J. Appl. Microbiol. – 1997. – V. 8. – N 1. – P. 204–210.
7. Ногіна Т. М., Підгорський В. С., Дульгерев О. М., Думанська Т. У. Новий комплексний біопрепарат для очищення ґрунту й води від забруднень нафтою та нафтопродуктами // Вісник Одеського національного університету. – 2001. – Т. 6. – № 4. – С. 224–227.
8. Смирнова З. С., Таптыкова С. Д. Использование пропана и его производных некоторыми видами проактиномицетов // Микробиология. – 1967. – НТ. 34, № 3. – С. 381–385.
9. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // FEMS Microbiol. Lett. – 1980. – V. 9. – N 1. – P. 29–33.
10. Турковская О. В., Дмитриева Т. В., Муратова А. Ю. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* – продуцент биоПАВ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 37. – № 1. – С. 80–85.
11. Lechevalier H. A. Nocardioform actinomycetes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. D. Holt. – Vol. 4. – Baltimore: Williams and Wilkins. – 1989. – P. 2348–2404.
12. Koizumi J.-I., Takeda M., Kurane R., Nakamura I. Synergetic flocculation of the bioflocculant FIX extracellularly produced by *Nocardia amarae* // J. Gen. Microbiol. – 1991. – V. 37. – N 2. – P. 447–454.
13. Данилова И. В., Ботвинко И. В., Егоров Н. С. Реологические свойства и некоторые функции эзополисахаридов *Azotobacter beijerinckii* и *Mycobacterium lacticolum* // Микробиология. – 1993. – Т. 62. – № 4. – С. 685–693.
14. Милько Е. С., Егоров Н. С. Гидрофильно-гидрофобные и адгезивные свойства диссоциантов *Rhodococcus rubropertinctus* // Микробиология. – 1994. – Т. 63. – № 2. – С. 382–384.
15. Никовская Г. Н., Гордиенко А. С., Глоба Л. И. Гидрофильно-гидрофобные свойства микроорганизмов при различных условиях культивирования // Микробиология. – 1989. – Т. 58. – № 3. – С. 448–451.

T. Nogina, T. Dymanska, V. Podgorsky

THE HYDROPHOBIC- HYDROPHILIC AND EMULSIFYING PROPERTIES OF *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS*, *GORDONIA RUBROPERTINCTUS* AND *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* GROWING ON DIFFERENT SUBSTRATES

The hydrophobic-hydrophilic and emulsifying properties of hydrocarbon-oxidizing strains of Rhodococcus erythropolis IMV B-7012, Gordonia rubropertinctus IMV Ac-5005 and Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7013 have been investigated. It is shown, that specified strains differ on a parameter of the cell surface hydrophobicity (PH), which has higher values at the cultures grown on hydrophobic (hexadecane), than on hydrophilic (ethanol) substrates. The greatest hydrophobicity (PH = 99.4–59.6 %) is revealed in the strain Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7013. In dependence on substrate and the growth phase of cultures PH for Rhodococcus erythropolis IMV B-7012 was 2.4–58.0 % and for Gordonia rubropertinctus IMV Ac-5005 – 9.6–31.0 %. The strain of Rhodococcus erythropolis IMV B-7012 shows emulsifying activity when it grows on the both substrates and Gordonia rubropertinctus IMV Ac-5005 – only on hexadecane. The emulsifying activity in strain Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7013 was not revealed.