

FUNCTION OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 SURFACE-ACTIVE AGENTS IN DESTRUCTION OF COMPLEX OIL POLLUTIONS WITH HEAVY METALS

T. Pirog, A. Konon, S. Parfenuk
National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241
Biosurfactants
destruction of oil
heavy metals

Article history:
Received 11.02.2014
Received in revised form
22.02.2014
Accepted 01.03.2013

Corresponding author:
T. Pirog
Email:
tapirof@nuft.edu.ua

ABSTRACT

The possibility of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 surfactants in the form of culture liquid for destruction complex with heavy metals (Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+}) oil pollution in water and soil was studied. It is shown that after treatment of strain IMB B-7241 culture liquid oil polluted water (2,6—6 g/l) and soil (20 g/kg) containing a mixture of various combinations of cations of copper, cadmium and lead (0,1—1,0 mmol), the degree of oil degradation at 30 days was 85—95%. Stimulating effect of Cu^{2+} on the oil destruction in water and soil was established, the mechanism of which may be to activate by the copper cations of alkane hydroxylases as *A. calcoaceticus* IMB B-7241, and the natural oxidizing microbiota.

РОЛЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 У ДЕСТРУКЦІЇ КОМПЛЕКСНИХ З ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ

Т.П. Пирог, А.Д. Конон, С.А. Парфенюк
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість використання поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у вигляді культуральної рідини для деструкції комплексних з важкими металами (Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+}) нафтових забруднень у воді і ґрунті. Показано, що після обробки культуральною рідиною штаму IMB B-7241 забрудненої нафтою води (2,6—6 г/л) і ґрунту (20 г/кг), що містили у різних комбінаціях суміш катіонів міді, кадмію і свинцю (0,1—1,0 мМ), ступінь деструкції нафти на 30 добу складав 85—95 %. Встановлено стимулювальний вплив Cu^{2+} на розкладання нафти у воді і ґрунті, механізм якого може полягати в активації катіонами міді алканідроксилаз як *A. calcoaceticus* IMB B-7241, так і природної нафтоокиснюальної мікробіоти.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхнево-активні речовини, деструкція нафти, важкі метали.

Масштабні нафтові забруднення є серйозною екологічною проблемою сьогодення. Під час видобутку, транспортування й переробки втрачається від 1,0 до 16,5% нафти та продуктів її переробки [1, 2]. Особливо така проблема актуальна для країн, що видобувають нафту. Так,, станом на 2010 р. загальна площа нафтових розливів у західному Казахстані становила 194 тис.га, а об'єм розлитої нафти — понад 5 млн. т [1]. За попередньою оцінкою, величина втрат сирої нафти у світі становить близько 10^8 т на рік, з яких приблизно 25 % потрапляють у Світовий океан, а інші - в ґрунт і прісні водойми.

Забруднення довкілля важкими металами також є гострою проблемою, що постала перед людством. Метали досить стійкі у навколошньому середовищі, що суттєво ускладнює їх утилізацію. Вони можуть накопичуватися в ґрунтах, ґрутових і стічних водах, звідки потрапляти у питну воду. Метали надходять у довкілля в результаті діяльності промислових підприємств (металургійної, гірничо-видобувної та машинобудівної галузі), а також з побутовими стоками. Найчастіше у ґрунті та воді накопичуються свинець, мідь, кадмій, никель, кобальт, ртуть, селен тощо [3, 4].

З літературних джерел [2, 5] відомо, що забруднення в екосистемах найчастіше мають комплексний характер (одночасна наявність як нафти, так і металів), тому актуальним є пошук таких методів очищення, які б дали змогу видаляти такі комбіновані забруднення.

Одним із сучасних підходів до охорони довкілля є використання поверхнево-активних речовин (ПАР) мікробного походження. На противагу синтетичним речовинам, мікробні ПАР можна використовувати не лише для заміни токсичних хімічних реагентів, що, у свою чергу, знижить навантаження на екосистеми, а й у процесах біоремедіації довкілля [2, 6]. Такі ПАР знаходять широке застосування у природоохоронних технологіях завдяки емульгувальним властивостям, здатності зв'язувати катіони металів і запобігати їхній повторній адсорбції на очищений поверхні, активувати нативну мікрофлору забруднених екосистем, а також високій активності в умовах екстремальних температур, солоності та pH [2, 6, 7].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером IMB B-7241. Для штаму IMB B-7241 встановлено здатність до синтезу ПАР на гідрофільних (етанол) і гідрофобних (*n*-гексадекан, рідкі парафіни) субстратах [8].

У подальших дослідженнях [9] доведено можливість використання поверхнево-активних речовин ПАР *A. calcoaceticus* K-4 для очищення води від нафти. Через 30 діб ступінь деградації нафти (2,6 г/л) за наявності 5—30 % препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатantu становив 81—95 %. Встановлено, що інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокислювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Мета даної роботи — дослідження впливу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на деструкцію нафти у воді та ґрунті за наявності катіонів важких металів.

Для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 використовували поживне середовище такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 1,0, Na_2HPO_4 — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 (об'ємна частка) [8]. Джерело вуглецю — *n*-гексадекан, рідкі парафіни і етанол в концентрації 2 (об'ємна частка). В експоненційній фазі росту у середовище з *n*-гексадеканом і рідкими парафінами вносили 0,5 mM Cu^{2+} у вигляді 1M розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Як інокулят використовували культури з експоненційної фази росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 0,5—1 % (об'ємна частка) субстрату. В одному з варіантів у процесі одержання інокуляту у середовище з етанолом вносили 0,1 і 0,5 mM Cu^{2+} у вигляді 1M розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Кількість посівного матеріалу (10^4 — 10^5 кл/мл) становила 5—10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28—30 °C упродовж 120 год.

Для моделювання забрудненого нафтою і катіонами металів ґрунту у пластикову ємність вносили 1 кг ґрунту, 25 мл нафти, препарати ПАР (300 мл), 0,01% диамонійфосфат як джерело біогенних елементів і перемішували. При комплексному забрудненні нафтою і катіонами металів у ґрунт вносили (окремо і в комбінаціях) 0,1—1,0 mM Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} у вигляді 1M розчинів солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ і $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ відповідно. Зразки кожні три дні примішували для покращення аерації та зволожували стерильною водою. Тривалість експерименту 20—30 діб. Для дослідження використовували нафту з родовища Долина Івано-Франківської обл. (Україна) густиноро 0,85 г/см³.

Для моделювання забруднених нафтою і металами водойм у пластикову ємність вносили 2 л бюветної води, на поверхню якої наносили 6—15 мл нафти, після чого додавали препарати ПАР у концентрації 5 % (об'ємна частка), а також 0,01—1,0 mM Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} окремо і в різних комбінаціях. Як джерело біогенних елементів використовували диамонійфосфат (0,01 %). Загальну кількість живих клітин у бюветній воді упродовж експерименту (до 30 діб) визначали методом Коха на МПА.

Кількість нафти визначали ваговим методом. Для цього здійснювали трикратну екстракцію нафти гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт упарювали до постійної маси на роторному випарнику IP-1М2 (Росія) при температурі 55 °C і абсолютному тиску 0,4 atm.

У попередніх дослідженнях [10] встановлено, що внесення 0,1—0,5 mM Cu^{2+} під час росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 як на гідрофільних (етанол), так і гідрофобних (*n*-гексадекан та рідкі парафіни) субстратах, супроводжувалося підвищенням показників синтезу ПАР на 50—140 % порівняно з вирощуванням на відповідних джерелах вуглецю без Cu^{2+} . Встановлено механізми підвищення синтезу ПАР за наявності Cu^{2+} , які полягають у здатності ПАР захищати клітини продуцента від токсичного впливу катіонів міді, активації алкангідроксилази АлкБ типу за культивування штаму IMB B-7241 на вуглеводневих субстратах і ферментів біосинтезу поверхнево-активних гліко- (фосфоенолпіруватсинтетаза) і аміноліпідів (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) за умов

БІОТЕХНОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ

росту на етанолі. Враховуючи одержані раніше результати, припустили, що ПАР, синтезовані за наявності у середовищі культивування Cu^{2+} , будуть ефективніше розкладати комплексні з катіонами важких металів нафтові забруднення. Подальші експерименти підтвердили наші припущення.

Як свідчать наведені у табл. 1 дані, після обробки води і ґрунту препаратами 2 і 3 ступінь розкладання нафти за наявності 0,1—0,5 mM катіонів міді був у середньому на 15—20 % вищим, ніж в аналогічних варіантах, оброблених препаратом 1.

Таблиця 1. Деструкція нафти у воді і ґрунті за наявності Cu^{2+} після обробки ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Концентрація Cu^{2+} у воді (ґрунті), mM	Препарат ПАР	Ступінь деструкції нафти у ґрунті, %	Ступінь деструкції нафти у воді, %
0	Без ПАР	3,5±0,15	2,0±0,10
0	1	84,1±4,1	91,6±4,6
	2	80,5±4,0	86,0±4,3
	3	80,0±4,0	89,2±4,4
0,1	1	75,6±3,7	72,7±3,6
	2	91,6±4,5	95,2±4,7
	3	90,0±4,5	91,6±4,6
0,5	1	70,3±3,5	70,7±3,5
	2	89,6±4,4	92,8±4,6
	3	84,8±4,1	86,8±4,3

Примітки: концентрація нафти у воді становила 4 г/л, у ґрунті — 20 г/кг. Як препарати ПАР використовували культуральну рідину після культивування штаму IMB B-7241 на етанолі з використанням інокуляту, вирощеного на: етанолі (препарат 1), етанолі за наявності 0,1 mM Cu^{2+} (препарат 2), етанолі за наявності 0,5 mM Cu^{2+} (препарат 3). Експозиція 30 діб.

Зазначимо, що відмінності між цими препаратами полягають у тому, що препарати 1 і 2 синтезовані з використанням інокуляту, вирощеного за внесення Cu^{2+} у середовище для його одержання. Крім того, наявність катіонів міді у воді та ґрунті стимулювала у більшості варіантів розкладання нафти (табл. 1). Це явище зумовлене тим, що Cu^{2+} є активатором алкангідроксилаз не тільки штаму-продуценту ПАР, як показано в [10], а й природної (автохтонної) нафтоокиснюальної мікробіоти. Для підтвердження цього припущення на наступному етапі аналізували зміни чисельності мікробіоти у воді впродовж експерименту (табл. 2).

Таблиця 2. Мікробіологічний контроль забрудненої нафтою і Cu^{2+} води після обробки різними препаратами ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Концентрація Cu^{2+} у воді, mM	Препарат ПАР	Загальна кількість клітин (КУО/мл) через (діб)		
		7	15	30
0	1	$(2,0\pm0,10)\cdot10^4$	$(2,9\pm0,14)\cdot10^6$	$(1,2\pm0,06)\cdot10^7$
	2	$(1,9\pm0,09)\cdot10^4$	$(2,7\pm0,13)\cdot10^6$	$(1,0\pm0,05)\cdot10^7$
	3	$(1,7\pm0,08)\cdot10^4$	$(2,8\pm0,13)\cdot10^6$	$(1,2\pm0,06)\cdot10^7$

Продовження табл. 2

0,1	1	$(2,1 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(3,8 \pm 0,19) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^7$
	2	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^4$	$(3,6 \pm 0,18) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,12) \cdot 10^7$
	3	$(2,3 \pm 0,12) \cdot 10^4$	$(3,6 \pm 0,18) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,12) \cdot 10^7$
0,5	1	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^4$	$(3,9 \pm 0,20) \cdot 10^6$	$(2,1 \pm 0,11) \cdot 10^7$
	2	$(2,1 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,20) \cdot 10^6$	$(2,1 \pm 0,11) \cdot 10^7$
	3	$(1,9 \pm 0,09) \cdot 10^4$	$(3,8 \pm 0,19) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,10) \cdot 10^7$

Примітки: концентрація нафти у воді 4,0 г/л. Як препарати ПАР використовували культуральну рідину після культивування штаму IMB B—7241 на етанолі з використанням інокуляту, вирощеного на: етанолі (препарат 1), етанолі за наявності 0,1 mM Cu²⁺ (препарат 2), етанолі за наявності 0,5 mM Cu²⁺ (препарат 3).

Результати, наведені у табл. 2, засвідчують, що у варіантах, які містять катіони міді, загальна кількість клітин мікроорганізмів на 30 добу експерименту була приблизно вдвічі вищою, ніж без Cu²⁺. Наші результати узгоджуються з даними метагеномного аналізу забруднених нафтою ґрунтів і водойм, який показав, що після забруднення нафтою в цих екосистемах спостерігається індукція AlkB генів, відповідальних за синтез алкангідроксилаз [11, 12].

У табл. 3 наведено дані про вплив культуральної рідини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на ступінь деструкції нафти (2,6 і 6,0 г/л) у воді, що містить суміш різних концентрацій катіонів міді і кадмію. Ці дані засвідчують, що навіть за наявності у воді 0,5—1,0 mM суміші катіонів кадмію і міді ступінь розкладання нафти залишався достатньо високим і становив 85—88 %.

Таблиця 3. Ступінь деструкції нафти у воді за наявності Cu²⁺ та Cd²⁺ після обробки ПАР штаму IMB B-7241

Обробка ПАР	Концентрація металу у воді, mM		Ступінь деструкції нафти, % за початкової концентрації (г/л)	
	Cu ²⁺	Cd ²⁺	2,6	6,0
—	0	0	$3,0 \pm 0,15$	$2,0 \pm 0,10$
	0	0	$90,8 \pm 4,5$	$88,5 \pm 4,4$
	0,5	0	$94,0 \pm 4,7$	$90,0 \pm 4,5$
	1,0	0	$88,4 \pm 4,4$	$87,6 \pm 4,4$
	0,5	0,5	$86,0 \pm 4,3$	$85,0 \pm 4,3$
	1,0	0,5	$87,3 \pm 4,4$	$88,0 \pm 4,4$

Примітки: як препарат ПАР використовували культуральну рідину *A. calcoaceticus* IMB B—7241, вирощену на гексадекані за внесення 0,5 mM Cu²⁺ (експоненційна фаза росту). Експозиція 30 діб.

Подальші дослідження (табл. 4) показали, що після обробки ПАР штаму IMB B-7241 води, що містить 3 г/л нафти і суміш катіонів трьох важких металів (Cu²⁺, Cd²⁺ і Pb²⁺), ступінь деструкції нафти досягав 90—92 %, а у разі підвищення концентрації нафти у воді до 6 г/л — знижувався незначно (до 85—88 %).

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження доведено можливість використання поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у вигляді куль-

туральної рідини для деструкції (85—95 %) комплексних з важкими металами (Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+}) нафтових забруднень у воді (2,6—6 г/л) і ґрунті (20 г/кг).

Таблиця 4. Вплив культуральної рідини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на деструкцію нафти у воді за наявності Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+}

Концентрація катіонів у воді, мМ			Ступінь деструкції нафти (%) за початкової концентрації (г/л)	
Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	3,0	6,0
0,5	0,1	0,1	92,7±4,6	88,5±4,4
0,5	0,1	0,5	92,0±4,6	87,7±4,4
0,5	0,5	0,1	90,2±4,5	85,2±4,3
0,5	0,5	0,5	90,0±4,5	85,1±4,3
Cu^{2+}	Pb^{2+}	Cd^{2+}	3,0	6,0
0,5	0,1	0,1	92,7±4,6	88,5±4,4

Примітки: Культивування штаму IMB B-7241 здійснювали на середовищі з рідкими парафінами. Експозиція 30 діб.

Література

1. Тыныбаева Т.Г. Мониторинг загрязнения почв на газо-нефтяном месторождении Северные Бузачи (Казахстан) // Нефтегазовое дело. — 2008. — № 6. — С. 5—11.
2. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97, № 6. — P. 2327—2339.
3. Kavamura V.N., Esposito E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soil polluted with heavy metals // Biotechnol. Adv. — 2010. — Vol. 28. — P. 61—69.
4. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // Microbiology. — 2010. — Vol. 156, № 3. — P. 609—643.
5. Tyagi M., Fonseca M.M.R, Carvalho C.C.C.R. Bioaugmentation and bio-stimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes // Biodegradation. — 2011. — Vol. 22, № 2 — P. 231—241.
6. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // Int. J. Mol. Sci. — 2011. — Vol 12, № 1. — P. 633—654.
7. Wang S., Mulligan C. Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings // Process Biochemistry. — 2009. — Vol. 44, № 3. — P. 296—301.
8. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. — 2009. — 45, № 3. — С. 304—310.
9. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Сорокина А.И. Вплив поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на ефективність мікробної деструкції нафтових забруднень // Мікробіол. журнал. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 8—13.
10. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софілканич А.П. Шевчук Т.А., Парфенюк С.А. Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter cal-*

coaceticus IMB B 7241 и *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 // Микробиол. журнал. — 2013. — Т. 75, № 1. — С. 3—13.

11. *Guibert L.M., Loviso C.L., Marcos M.S., Commendatore M.G., Dionisi H.M., Lozada M.* Alkane biodegradation genes from chronically polluted subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure // Microb. Ecol. — 2012. — Vol. 64, № 3. — P. 605—616.

12. *Jurelevicius D., Alvarez V.M., Peixoto R., Rosado A.S., Seldin L.* The use of a combination of alkB primers to better characterize the distribution of alkane-degrading bacteria // PLoS One. — 2013. — Vol. 8, № 6. doi:10.1371/journal.pone.0066565.

РОЛЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 В ДЕСТРУКЦИИ КОМПЛЕКСНЫХ С ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Т.П. Пирог, А.Д. Конон, С.А. Парфенюк

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована возможность использования поверхности-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 в виде культуральной жидкости для деструкции комплексных с тяжелыми металлами (Cu^{2+} , Cd^{2+} і Pb^{2+}) нефтяных загрязнений в воде и почве. Показано, что после обработки культуральной жидкостью штамма IMB B-7241 загрязненной нефтью воды (2,6—6 г/л) и почвы (20 г/кг), содержащих в различных комбинациях смесь катионов меди, кадмия и свинца (0,1—1,0 мМ) степень деструкции нефти на 30 сут составляла 85—95 %. Установлено стимулирующее влияние Cu^{2+} на разложение нефти в воде и почве, механизм которого может состоять в активации катионами меди алкангидроксилаз как *A. calcoaceticus* IMB B-7241, так и природной нефтеокисляющей микробиоты.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхно-активные вещества, деструкция нефти, тяжелые металлы.