

*Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Ю.О. Клименко*

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

## ОСОБЛИВОСТІ ОКИСНЕННЯ АЛКАНІВ У *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1 – ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

У клітинах штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, вирощеного на *n*-гексадекані, визначено активність ферментів окиснення *n*-гексадекану і *n*-гексадеканолау.

Показано, що окиснення *n*-гексадекану у *R. erythropolis* ЕК-1 здійснюється алкангідроксилазним комплексом, що містить залізосіркопротеїд рубредоксин. Підвищення концентрації іонів заліза у середовищі культивування бактерій до 10 мг/л супроводжувалося збільшенням активності алкангідроксилізи у 2 рази. Встановлено, що катіони натрію є активатором, а катіони калію – інгібітором алкангідроксилізи *R. erythropolis* ЕК-1.

За умов росту на *n*-гексадекані у клітинах *R. erythropolis* ЕК-1 виявлено чотири алкогольдегідрогенази – НАД<sup>+</sup>-, НАДФ<sup>+</sup>-, піролахінолінхінон(ПХХ)- і 4-нітросо-*N,N*-диметиланілін (НДМА)-залежні ферменти. Активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази була максимальною (до 110-120 нмоль·хв<sup>-1</sup>·мг<sup>-1</sup>білка) у ранній експоненційній фазі росту бактерій.

Одержані дані є основою для вдосконалення технології одержання поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1.

**Ключові слова:** *Rhodococcus erythropolis*, метаболізм, *n*-алкани, алкангідроксиліза, алкогольдегідрогеназа.

У попередніх дослідженнях було показано, що штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ізолюваний нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, характеризується здатністю до синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту на *n*-гексадекані [1]. Встановлено умови культивування штаму (природа і концентрація джерела азоту, концентрація *n*-гексадекану, співвідношення С/Н, тривалість процесу, режими масообміну тощо), що дали змогу підвищити у три рази показники синтезу ПАР.

Відомо, що у послідовності метаболічних реакцій, пов'язаних з утворенням ключових інтермедіатів конструктивного метаболізму, може бути «вузьке місце» – реакція, швидкість якої нижча від інших або пов'язана з великою витратою енергії чи втратою вуглецю субстрату. Виявлення таких сайтів метаболічного лімітування, розробка підходів до їхнього усунення і визначення на основі цих знань принципів регуляції енергетичного та конструктивного метаболізму дасть змогу реалізувати біотехнологічні процеси з найвищою ефективністю.

**Мета** даної роботи – дослідження деяких особливостей метаболізму *n*-гексадекану і *n*-гексадеканола у *R. erythropolis* ЕК-1.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень був штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ під номером ІМВ Ас-5017.

**Культигування *R. erythropolis* ЕК-1.** Бактерії вирощували на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л), середовище 1: KNO<sub>3</sub> – 1,0; NaCl – 1,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,14; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,001, рН 6,8-7,0. У середовищі 2 нітрат калію був замінений на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію (1,3 г/л). Як джерело вуглецю і енергії використовували *n*-гексадекан у концентрації 1% (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищах наведеного вище складу з 0,3 % *n*-гексадекану.

Вирощування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл зі 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 24–72 год.

**Одержання безклітинних екстрактів.** Культуральну рідину, одержану після культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому середовищі з *n*-гексадеканом, обробляли гексаном для видалення залишків гексадекану, після чого відділяли клітини бактерій фільтруванням під вакуумом. Осад клітин на паперовому фільтрі послідовно (під вакуумом) про-

мивали гексаном і 0,05 М  $K^+$ -фосфатним буфером (рН 7,0). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М  $K^+$ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 4 рази по 60 с при температурі 4 °С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4°С), осад відкидали, а надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

**Ензиматичні аналізи.** Активність алкангідроксилази (КФ 1.14.15.3) визначали спектрофотометрично за окисненням НАДФН при 340 нм з використанням *n*-гексадекану як донора електронів [11].

Активність алкогольдегідрогенази КФ 1.1.1.1 [3], КФ 1.1.1.2 [4], КФ 1.1.1.164 [7], КФ 1.1.1.192 [10] аналізували спектрофотометрично за відновленням НАД<sup>+</sup> чи НАДФ<sup>+</sup> при 340 нм з використанням як донора електронів *n*-гексадеканолю.

Активність алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.99.8) аналізували спектрофотометрично за відновленням дихлорфеноліндофенолу за присутності феназинметасульфату (ФМС) при 600 нм [2] з *n*-гексадеканолюм як донором електронів.

Активність нікотинопротеїнової (НАД(Ф)Н-вмісної) алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.99. —) визначали спектрофотометрично за відновленням 4-нітрузо-*N,N*-диметиланіліну (НДМА) при 440 нм з *n*-гексадеканолюм, етанолом і гліцерином як донорами електронів [9].

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [4].

Активність ферментів аналізували при температурі 28–30 °С, яка є оптимальною для росту *R. erythropolis* ЕК-1.

**Результати та їх обговорення.** У мікроорганізмів, які асимілюють алифатичні вуглеводні, виявлено кілька варіантів метаболізму цих гідрофобних субстратів. У представників родів *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* реакція окиснення алканів до відповідних первинних спиртів здійснюється алкангідроксилазним ферментним комплексом, що складається з алкангідроксилази, рубредоксину і рубредоксинредуктази [11, 13]. Алкангідроксилази є мембранзв'язаними залізовмісними ферментами. У деяких штамів роду *Acinetobacter* за умов росту на  $C_{13}$ – $C_{44}$ -алканах функціонує алкандіоксигеназа, що каталізує перетворення алканів в альдегіди через алкілгідропероксид, деякі штами використовують цитохром Р450-монооксигеназну систему [13]. Всі відомі цитохром Р450-монооксигеназні системи є дифлавінами (містять як ФАД, так і ФМН). У *Rhodococcus ruber* DSM 44319 виявлено незвичну цитохром Р450-монооксигеназну систему, до складу якої входить флавінвмісна редуктаза, а флавін представлений рибофлавін-5-монофосфатом [6].

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що заміна нітрату калію на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію у середовищі супроводжувалась підвищенням показників синтезу ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на *n*-гексадекані [1]. У праці [1] ми висловили припущення, що катіони  $Na^+$  можуть бути активаторами певних ферментів метаболізму цього субстрату. Для перевірки цього припущення аналізували активність ферментів окиснення *n*-гексадекану і *n*-гексадеканолю у процесі культивування бактерій на середовищах з різним вмістом катіонів калію і натрію (середовище 1 і 2, див. вище).

У клітинах *R. erythropolis* ЕК-1, вирощених на *n*-гексадекані, виявлено високу активність алкангідроксилази (табл. 1), причому на середовищі 2 з високим вмістом катіонів натрію алкангідроксилазна активність була у 3–3,5 рази вищою, ніж на середовищі 1. Ці дані можуть свідчити про те, що  $Na^+$  є активатором цього ферменту. Для перевірки такого припущення на наступному етапі аналізували залежність активності алкангідроксилази від різних концентрацій катіонів калію і натрію у реакційній суміші. Дані наведено у табл. 2. Як видно з наведених даних, алкангідроксилазна активність знижується у 3–6 рази за наявності 25–100 мМ  $K^+$ , у той час як за наявності 50 мМ  $Na^+$  активність ферменту підвищується у 1,5 рази.

Попередні дослідження показали залежність показників синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від наявності у середовищі іонів заліза [1]. Так, за відсутності у середовищі культивування  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  спостерігали зниження у 3 разів кількості синтезованих

поверхнево-активних речовин. З літературних джерел відомо, що для індукції алкангідроксилазних генів у *Pseudomonas oleovorans* вміст заліза у середовищі повинен становити 2,9–3,6 мкмоль/г біомаси [11]. Цікаво, що індукція цих генів за наявності необхідної кількості заліза відбувається навіть за умов росту бактерій на середовищі з глюкозою. Для індукції залізовмісної цитохром Р450-монооксигенази у *P. putida* РрG786 вміст заліза у середовищі повинен бути досить високим – 720 мкмоль/л. Підвищення у 2–3 рази кількості синтезованого сурфактину спостерігали за умови збільшення концентрації іонів заліза у середовищі культивування *Bacillus subtilis* ATCC 21332 до 4 мкмоль/л – 5 ммоль/л [14].

Наші експерименти показали, що наявність 10 мг/л  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 забезпечує підвищення активності алкангідроксилази у 2 рази порівняно з вирощуванням штаму на середовищі, в яке не вносили сіль заліза (табл. 3). Цікаво зазначити, що за наявності сульфату заліза тільки у середовищі при одержанні посівного матеріалу і відсутності його у середовищі під час біосинтезу активність алкангідроксилази знижувалась незначно (на 15–20 %). Звертає на себе увагу той факт, що активність алкангідроксилази залишалася на рівні 100–350 нмоль · хв<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup> білка навіть за відсутності сульфату заліза у середовищі як при одержанні інокуляту, так і під час біосинтезу (табл. 3). Очевидно, необхідна для індукції алкангідроксилази кількість заліза міститься в інших солях, які використовували для приготування поживного середовища, або у воді, на якій готували середовище.

Таблиця 1

Активність алкангідроксилази і алкогольдегідрогеназ за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на *n*-гексадекані

Ферменти		Активність (нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка) за умов росту на	
		середовищі 1	середовищі 2
Алкангідроксилаза		194,4±9,5	698,3±32,2
Алкоголь-дегідрогеназа	НАД <sup>+</sup> -залежна (рН 9,0)	7,9±0,3	9,4±0,4
	НАД <sup>+</sup> -залежна (рН 9,0) за присутності 1 мМ ZnSO <sub>4</sub>	98,3±4,9	102,6±5,0
	НАДФ <sup>+</sup> -залежна (рН 9,0)	5,5±0,2	4,7±0,2
	ПХХ-залежна	100,5±5,0	103,7±5,1
	НДМА-залежна	15,4±0,7 (65,3±3,1)	32,6±1,6 (115,9±5,3)

Примітка. Клітини вирощені до кінця експоненційної фази росту (72 год). У дужках вказана активність ферментів у ранній експоненційній фазі росту (24 год).

Таблиця 2

Вплив катіонів калію і натрію на активність алкангідроксилази *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1

Концентрація у реакційній суміші, мМ		Активність (нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка) за умов росту на	
K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	середовищі 1	середовищі 2
0	0	194,4±9,5	698,3±32,2
25	0	Н.в.	116,4±5,4
50	0	Н.в.	232,3±10,5
100	0	Н.в.	232,0±10,5
0	25	242,9±12,1	Н.в.
0	50	300,4±14,0	Н.в.
0	100	240,7±11,4	Н.в.

Примітка. Клітини вирощені до кінця експоненційної фази росту (72 год). Н.в. – не визначали.

Залежність активності алкангідроксилази від наявності у середовищі культивування  
*Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 солей заліза

Концентрація $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у середовищі, мг/л		Активність (нмоль $\cdot$ хв <sup>-1</sup> $\cdot$ мг <sup>-1</sup> білка) за умов росту на	
під час одержання інокуляту	у процесі біосинтезу	середовищі 1	середовищі 2
0	0	95,6 $\pm$ 4,7	325,4 $\pm$ 15,7
10	0	156,7 $\pm$ 7,3	600,8 $\pm$ 25,6
10	10	194,4 $\pm$ 9,5	698,3 $\pm$ 32,2

Примітка. Клітини вирощені до кінця експоненційної фази росту (72 год).

Раніше (неопубліковані дані) нами було показано, що за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі в окисненні цього субстрату беруть участь чотири алкогольдегідрогенази – НАД<sup>+</sup>-, НАДФ<sup>+</sup>-, піролохінолінхінон(ПХХ)- і 4-нітрузо-*N,N*-диметиланілін(НДМА)-залежні ферменти. Експерименти показали, що ці ж ферменти функціонують у клітинах бактерій у процесі культивування на *n*-гексадекані (табл. 1). Активність НАД<sup>+</sup>- і НАДФ<sup>+</sup>-залежних алкогольдегідрогеназ була невисокою, і, як і під час росту на етанолі, очевидно, не має суттєвого значення для метаболізму гексадеканолу. У той же час цікаво зазначити, що активність НАД<sup>+</sup>-залежного ферменту підвищувалась майже на порядок (до 100 нмоль  $\cdot$  хв<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> білка) за наявності 1 мМ  $\text{ZnSO}_4$ . Ці дані можуть свідчити про те, що НАД<sup>+</sup>-залежна алкогольдегідрогеназа *R. erythropolis* ЕК-1 належить до першої групи мікробних алкогольдегідрогеназ і представлена довголанцюговим (містить близько 350 амінокислотних залишків) цинк-залежним ферментом [8].

На відміну від культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі, за умов росту на *n*-гексадекані активність ПХХ-залежної алкогольдегідрогенази виявилась досить високою (до 100 нмоль  $\cdot$  хв<sup>-1</sup>  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> білка) (табл. 1). На нашу думку це явище можна пояснити так: враховуючи, що алкангідроксилаза є мембранзв'язаним ферментом, то більш ймовірним видається й окиснення алканолів мембранзв'язаними (як, наприклад, ПХХ-залежний фермент), а не розчинними алкогольдегідрогеназами. У літературі нам не вдалося знайти відомостей щодо функціонування ПХХ-залежної алкогольдегідрогенази у представників роду *Rhodococcus* за умов росту на алканах. Є дані про ПХХ-залежний фермент *R. erythropolis* DCL14, здатний окиснювати карвеол у карвон [5]. Відомо також, що цей фермент бере участь в окисненні середньоланцюгових алканів у *P. putida* (*oleovorans*) [12].

Як і за умов культивування на етанолі, у процесі росту на *n*-гексадекані активність НДМА-залежного ферменту була найвищою у ранній експоненційній фазі росту (табл. 1). Виявилось цікавим, що клітини *R. erythropolis* ЕК-1, вирощені на етанолі, проявляли НДМА-залежну дегідрогеназну активність щодо *n*-гексадеканолу і навпаки – у клітинах, вирощених на *n*-гексадекані, виявляли здатність НДМА-залежного ферменту окиснювати етанол і гліцерин (табл. 4). Така широка субстратна специфічність алкогольдегідрогенази *R. erythropolis* ЕК-1 дає змогу розглядати і сам штам, і його ферментні системи як перспективні для використання у різних природоохоронних технологіях.

Таким чином, у результаті проведеної роботи визначено активність ферментів у *R. erythropolis* ЕК-1, що здійснюють окиснення *n*-гексадекану і *n*-гексадеканолу. Встановлено умови культивування бактерій, що забезпечують підвищення алкангідроксилазної активності у 2–3,5 рази. Такими умовами є наявність у середовищі культивування іонів заліза (до 10 мг/л) і мінімальна концентрація катіонів калію (інгібіторів ферменту).

Активність НДМА-залежної алкогольдегідрогенази за умов росту *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на *n*-гексадекані і етанолі

Ростовий субстрат	Субстрат при визначенні активності	Активність НДМА-АДГ (нмоль · хв <sup>-1</sup> · мг <sup>-1</sup> білка)
Етанол	Етанол	16,4±0,8
	<i>n</i> -Гексадекан	6,5±0,3
<i>n</i> -Гексадекан	<i>n</i> -Гексадекан	77,3±3,5
	Етанол	54,3±2,6
	Гліцерин	54,0±2,6

**Примітка.** Клітини з середини експоненційної фази росту (48 год). АДГ – алкогольдегідрогеназа.

*Т.П. Пирог, Т.А.Шевчук, Ю.А. Клименко*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ АЛКАНОВ У *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЭК-1 – ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

## Резюме

В клетках штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, выращенного на *n*-гексадекане, определена активность ферментов окисления *n*-гексадекана и *n*-гексадеканола.

Показано, что окисление *n*-гексадекана у *R. erythropolis* ЭК-1 осуществляется алкангидроксилазным комплексом, содержащим железосеропроteid рубредоксин. Повышение концентрации ионов железа в среде культивирования бактерий до 10 мг/л сопровождалось увеличением активности алкангидроксилазы в 2 раза. Установлено, что катионы натрия являются активатором, а катионы калия – ингибитором алкангидроксилазы *R. erythropolis* ЭК-1.

При культивировании на *n*-гексадекане в клетках *R. erythropolis* ЭК-1 выявлено четыре алкогольдегидрогеназы – НАД<sup>+</sup>-, НАДФ<sup>+</sup>-, пирролохинолинхинон(ПХХ)- и 4-нитрозо-*N,N*-диметиланилин (НДМА)-зависимые ферменты. Активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы была максимальной (до 110-120 нмоль · мин<sup>-1</sup> · мг<sup>-1</sup> белка) в ранней экспоненциальной фазе роста бактерий.

Полученные данные являются основой для усовершенствования технологии получения поверхностно-активных веществ *R. erythropolis* ЭК-1.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus erythropolis*, метаболизм, *n*-алканы, алкангидроксилаза, алкогольдегидрогеназа.

*T.P. Pirog, T. A. Shevchuk, Yu. O. Klimenko*

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

PARTICULARITIES OF ALKANES OXIDATION IN *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* EK-1 STRAIN – PRODUCER OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES

## Summary

The hexadecane oxidation of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 was established to be catalyzed by the alkane hydroxylase complex containing Fe-S proteid rubredoxin. Alkane hydroxylase activity was increased twice in the presence of 10 mg/l iron ions in the cultivation medium. Sodium ions were shown to be an activator of alkane hydroxylase. Four types of alcohol dehydrogenases (NAD, NADP, pyrroloquinoline quinone and *N,N*-dimethyl-4-nitrosoaniline-dependent enzymes) were found in hexadecane-grown cells of *R.erythropolis* EK-1. The obtained data are the basis for the improvement of surface active substances technology.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** *Rhodococcus erythropolis*, metabolism, alkanes, alkane hydroxylase, alcohol dehydrogenase.

The author's address: *T.P. Pirog*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Пирог Т.П., Волошина И.Н., Иенатенко С.В., Вильданова-Марцишин Р.И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. – 2005. – № 6. – С. 27–36.
2. Anthony C., Zatman L.J. The microbial oxidation of methanol. Purification and properties of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27 // Biochem. J. – 1967. – **104**. – P. 953–955.
3. Beardmore-Gray M., Anthony C. The absence of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* // J. Gen. Microbiol. – 1983. – **129**, N 10. – P. 2979–2983.
4. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
5. de Carvalho C., da Fonseca M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **67**. – P. 715–726.
6. Liu L., Schmid R.D., Urlacher V.B. Cloning, expression and characterization of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase from *Rhodococcus ruber* DSM 44319 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – **72**. – P. 876–882.
7. Nagashima H., Inoue J., Sasaki E., Yamamoto S., Sasaki Y., Yamauchi-Inomata Y., Harayama S. Long-chain n-alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas putida* // J. Ferment. Bioeng. – 1996. – **82**. – P. 328–333.
8. Reid M.F., Fewson C.A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases // Crit. Rev. Microbiol. – 1994. – **20**. – P. 13–56.
9. Schenkels P., Duine J.A. Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069: an efficient catalyst for coenzyme-independent oxidation of broad spectrum of alcohols and interconversion of alcohols and aldehydes // Microbiology. – 2000. – **146**. – P. 775–785.
10. Singer M.E., Finnerty W.R. Alcohol dehydrogenase in *Acinetobacter* sp. strain HO1-N: role in hexadecane and hexadecanol metabolism // J. Bacteriol. – 1985. – **164**. – P. 1017–1024.
11. Staijen I.E., Witholt B. Synthesis of alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans* increases the iron requirement of *alk+* bacterial strains // Biotech. Bioeng. – 1998. – **57**, N 2. – P. 228–237.
12. van Beilen J.B., Eggink G., Enequist H., Bos R., Witholt B. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans* // Mol. Microbiol. – 1992. – **6**, N 21. – P. 3121–3136.
13. van Beilen J.B., Funhoff E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **74**. – P. 13–21.
14. Wei Y.H., Chu I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21322 // Enzyme Microb. Technol. – 1998. – **22**. – P. 724–728.

Отримано 03.03.2008

УДК 615.015.21 + 665.7.035.7

### О.В. Труфанов

Інститут птахівництва Української академії аграрних наук  
вул. Леніна, 20, с. Бірки, Зміївський р-н, Харківська обл., Україна

## ВПЛИВ НАФТАЛІНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ НА ЧУТЛИВІСТЬ *CANDIDA PSEUDOTROPICALIS* 44ПК ДО ТРИХОТЕЦЕНОВИХ МІКОТОКСИНІВ

Наявність у зерні та зернових продуктах Т-2 токсину та НТ-2 токсину визначають біоавтографічним методом або диск-дифузійним методом із використанням *Candida pseudotropicalis* 44 пк. З метою підвищення чутливості методу до складу поживного середовища для *C. pseudotropicalis* 44 пк вносили Т-2 токсин, нафталін, 1-нафтол, 2-нафтол, 1-нафтилацетат, 2-нафтилацетат, 1-нафтиламін і 1-нітрозо-2-нафтол. Додавання будь-якої з досліджених сполук, за винятком Т-2 токсину, призводило до потенціалізації токсичної дії Т-2 токсину та НТ-2 токсину. Внесення у середовище 1-нафтилацетату у концентрації 0,16 мг/мл дало змогу підвищити чутливість біоавтографічного методу в 5 разів до Т-2 токсину та у 10 разів до НТ-2 токсину. Модифікований біоавтографічний метод дозволяє виявити від 10 нг Т-2 токсину та від 100 нг НТ-2 токсину. Синергізм трихотеценових мікотоксинів та похідних нафталіну підвищує ризик виникнення негативних ефектів при одночасній дії цих сполук на живі організми.

**Ключові слова:** *Candida pseudotropicalis* 44 пк, біоавтографія, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, нафталін, 1-нафтилацетат, синергізм.

Методи токсикологічного аналізу, що базуються на використанні чутливих організмів, є незамінним інструментом контролю якості зерна і зернових продуктів. Під токсичністю речовини розуміють ступінь її несумісності з життям. На відміну від фізико-хімічних

© О.В. Труфанов, 2009