

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Исследовали образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 при внесении Cd^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} в среду с углеводородами и глицерином.

Установлено, что добавление 0,1 мМ Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста штамма IMB B-7405 на глицерине или совместное внесение Cu^{2+} (0,1 мМ) и Cd^{2+} (0,3 мМ), Cu^{2+} (0,1 мМ) и Pb^{2+} (0,3 мМ) в стационарной фазе сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 53 и 20–26 % соответственно по сравнению с показателями на среде без катионов металлов. Показано, что поверхностно-активные вещества *N. vaccinii* IMB B-7405 защищают клетки продуцента от действия тяжелых металлов. После удаления ПАВ выживаемость клеток в присутствии Cu^{2+} (1,5–2,5 мМ), Cd^{2+} или Pb^{2+} (0,1–0,3 мМ) снижалась в несколько раз (до 5–45 %).

Установлено ингибирующее действие Cu^{2+} на активность алкангидроксилазы (первого фермента катаболизма углеводов) и стимулирующее – на активность фосфоенолпируватсинтетазы (фермента биосинтеза поверхностно-активных гликолипидов) у *N. vaccinii* IMB B-7405.

К л ю ч е в ы е с л о в а: поверхностно-активные вещества, тяжелые металлы, защитные функции, биосинтез

В предыдущих исследованиях [3] было показано, что штамм *Nocardia vaccinii* K-8 (IMB B-7405), изолированный нами из загрязненной нефтью почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества (ПАВ) при культивировании в среде с глицерином. Позже [7] была установлена возможность использования этим штаммом технического глицерина (глицериновая фракция, отход производства биодизеля) для синтеза ПАВ, а также возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ на этом субстрате в присутствии предшественников углеводной и липидной природы.

В работе [6] мы показали, что концентрация катионов металла (на примере Cu^{2+}) и момент его внесения в среду культивирования могут являться фактором интенсификации синтеза микробных ПАВ. Так, при исследовании синтеза ПАВ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 в зависимости от концентрации и момента внесения в среду с различными углеродными субстратами катионов меди было установлено, что добавление Cu^{2+} в экспоненциальной фазе роста штаммов сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 25–140 % по сравнению с показателями на среде без катионов меди [6]. Максимальная интенсификация синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 наблюдалась при внесении Cu^{2+} в среду с углеводородами. В этой же работе было показано, что катионы меди являются активаторами алкангидроксилазы обоих штаммов, а также ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- и аминлипидов у *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Другим адаптационным механизмом, обуславливающим повышение концентрации образующихся ПАВ в присутствии катионов меди, может быть увеличение синтеза протекторных соединений в ответ на неблагоприятные факторы внешней среды [1]. Так, например, *Bacillus subtilis* при снижении температуры до 15 °С синтезирует белки с высоким содержанием глицина и пролина [16]. *R. erythropolis* в неоптимальных условиях (4–20 °С, pH 3–11, концентрация хлорида натрия до 7,5 % и наличие 1 % сульфата меди) образует полиненасыщенные жирные кислоты, синтеза которых не наблюдается в оптимальных условиях [13]. Некоторые штаммы *Escherichia coli* в присутствии катионов металлов синтезируют связывающие их протекторные белки [14]. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в анаэробных условиях погибают, однако при добавлении экзогенных рамнолипидов рост восстанавливается и начинается синтез ПАВ [15].

© Т.П. Пирог, А.Д. Конон, К.А. Покора, Т.А. Шевчук, Г.А. Иутинская, 2014

Установлено, что одним из механизмов детоксикации тяжелых металлов поверхностно-активными веществами является образование комплекса «ПАВ–металл», благодаря чему ПАВ способны защищать клетки продуцента и других микроорганизмов от действия металлов [9–11, 17].

Цель данной работы – исследовать рост и синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* IMB B-7405 на средах с различными источниками углерода в присутствии катионов тяжелых металлов, а также защитные функции поверхностно-активных веществ.

Материалы и методы. Объектом исследований являлся штамм *N. vaccinii* IMB B-7405, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины.

Культивирование *N. vaccinii* IMB B-7405 осуществляли в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; pH 6,8–7,0. В качестве источника углерода и энергии использовали *n*-гексадекан и жидкие парафины (C_{10} – C_{14}) в концентрации 2 % (по объему), а также глицерин (1 % по объему).

В начале процесса культивирования, в экспоненциальной и стационарной фазе роста штамма IMB B-7405 в среду вносили Cu^{2+} (0,1 и 0,5 мМ), Cd^{2+} (0,1–0,3 мМ) и Pb^{2+} (0,1–0,3 мМ) в виде 1М растворов солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ соответственно.

При исследовании комплексного действия катионов двух металлов на рост и синтез ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 в экспоненциальной и стационарной фазе роста в среду с глицерином одновременно вносили Cu^{2+} и Cd^{2+} , Cu^{2+} и Pb^{2+} ; в одном из вариантов катионы меди добавляли в экспоненциальной фазе с последующим внесением катионов кадмия или свинца в стационарной фазе. Концентрация Cu^{2+} составляла 0,1 мМ, Cd^{2+} и Pb^{2+} – 0,3 мМ.

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную на среде указанного выше состава с 0,5 % глицерина, *n*-гексадекана или жидких парафинов. Количество инокулята – 10 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 кл/мл).

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 48–240 ч.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую биомассу по калибровочному графику. Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина) и индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %), которые определяли, как описано нами ранее [1].

Для исследования защитных функций ПАВ культуральную жидкость после выращивания штамма IMB B-7405 в среде с глицерином до середины экспоненциальной и стационарной фазы центрифугировали (10000 g, 5 мин), осадок дважды промывали от остатков среды стерильной водопроводной водой, центрифугируя (10000 g, 5 мин), после чего ресуспендировали в исходном объеме стерильной водопроводной воды, получая клетки, лишенные ПАВ. В пробирки типа errendorf вносили по 1,5 мл культуральной жидкости (клетки + ПАВ) и суспензии клеток, лишенных ПАВ. Cu^{2+} (1,5–2,5 мМ), Cd^{2+} и Pb^{2+} (0,1–0,5 мМ) добавляли в культуральную жидкость и суспензию клеток в виде 1М растворов солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ соответственно, выдерживали в термостате (30 °С) в течение 1 ч. Количество живых клеток во всех вариантах опыта определяли по методу Коха на МПА.

Для получения бесклеточных экстрактов культуральную жидкость, полученную после выращивания штамма IMB B-7404 в среде с глицерином, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4 °С). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М K^+ -фосфатным буфером (pH 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4 °С). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М K^+ -фосфатном буфере (pH 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40–60 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1. Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °С), осадок удаляли, а надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Культуральную жидкость, полученную после выращивания *N. vaccinii* IMB B-7405 в среде с *n*-гексадеканом, обрабатывали гексаном для удаления остатков *n*-гексадекана, после чего отделяли клетки бактерий фильтрованием под вакуумом на воронке Бюхнера. Осадок клеток на бумажном фильтре последовательно (под вакуумом) промывали гексаном и 0,05 М K^+ -фос-

фатным буфером, pH 7,0. Отмытые клетки суспендировали в 0,05 М К⁺-фосфатном буфере, pH 7,0, после чего разрушали ультразвуком, как описано выше.

Активность алкангидроксилазы (КФ 1.14.15.3), никотинопротеиновой (НАД(Ф)Н-содержащей) алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.99.36), пирролохинолинкинон(ПХХ)-зависимой глицериндегидрогеназы (КФ 1.1.99.22) и фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (КФ 2.7.9.2) анализировали согласно [1, 2, 4, 5]. При исследовании влияния катионов меди на активность ферментов в реакционную смесь вносили 0,01; 0,05 и 0,1 мМ Cu²⁺ в виде 5%-ного раствора CuSO₄·5H₂O.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [1, 2, 4, 5]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости p<0,05.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные по влиянию Cu²⁺ на рост *N. vaccinii* IMB В-7405 и синтез ПАВ в зависимости от концентрации катионов меди и момента их внесения в среду с глицерином, *n*-гексадеканом и жидкими парафинами. Полученные для штамма IMB В-7405 результаты отличаются от установленных ранее для *A. calcoaceticus* IMB В-7241 и *R. erythropolis* IMB Ас-5017 [6]. Так, во-первых, при внесении Cu²⁺ в среду с углеводородами не наблюдали повышения синтеза ПАВ штаммом IMB В-7405. Во-вторых, пересев клеток *N. vaccinii* IMB В-7405, выращенных на *n*-гексадекане и жидких парафинах в присутствии Cu²⁺, на среду без катионов меди не сопровождался повышением показателя условной концентрации ПАВ и индекса эмульгирования по сравнению с использованием аналогичного инокулята, полученного на среде без Cu²⁺. В то же время при внесении 0,1 мМ Cu²⁺ в экспоненциальной фазе роста штамма IMB В-7405 на глицеринсодержащей среде наблюдали увеличение показателя ПАВ* в 1,5 раза по сравнению с культивированием бактерий на среде без катионов меди. Добавление 0,1 мМ Cu²⁺ в стационарной фазе роста *N. vaccinii* IMB В-7405 на среде с глицерином сопровождалось незначительным повышением условной концентрации ПАВ, однако при этом индекс эмульгирования культуральной жидкости увеличивался на 20 % по сравнению с таковым на среде без Cu²⁺ (табл. 1). Отметим, что, независимо от природы источника углерода в среде культивирования штамма IMB В-7405, концентрации и момента внесения катионов меди, концентрация биомассы составляла 0,8–0,9 г/л и была практически такой же, как и при выращивании бактерий на среде без Cu²⁺.

Таблица 1

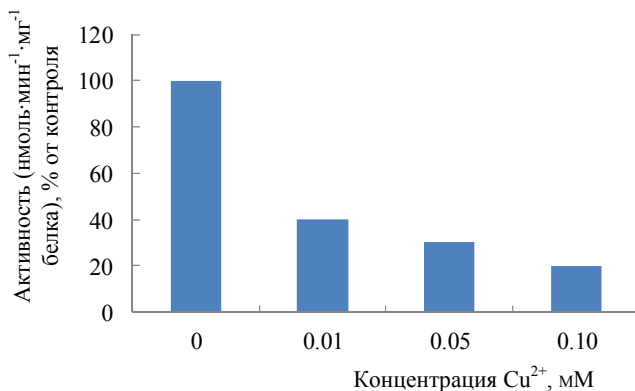
Показатели роста и синтеза ПАВ при культивировании *N. vaccinii* IMB В-7405 на различных углеродных субстратах в присутствии Cu²⁺

Субстрат	Момент внесения Cu ²⁺ (фаза роста)	Концентрация Cu ²⁺ , мМ	Биомасса, г/л	ПАВ*	E ₂₄ , %
Глицерин	–	0	0,9±0,05	3,0±0,15	53
		0,1	0,8±0,04	4,6±0,23	64
	Экспоненциальная	0,5	0,7±0,03	2,4±0,12	58
		0,1	0,9±0,05	3,5±0,17	73
			0,5	0,8±0,04	2,6±0,13
		Стационарная	0,1	0,9±0,05	3,5±0,17
0,5	0,8±0,04		2,6±0,13	60	
<i>n</i> -Гексадекан	–	0	0,9±0,05	2,9±0,15	66
		0,1	0,8±0,04	1,9±0,09	69
	Экспоненциальная	0,5	0,8±0,04	1,3±0,06	51
		0,1	0,8±0,04	2,8±0,14	52
			0,5	0,8±0,04	2,0±0,10
		Стационарная	0,1	0,8±0,04	2,8±0,14
0,5	0,8±0,04		2,0±0,10	53	
Жидкие парафины	–	0	0,9±0,05	2,6±0,13	65
		0,1	0,8±0,04	2,3±0,11	68
	Экспоненциальная	0,5	0,7±0,03	2,2±0,11	62
		0,1	0,8±0,04	2,7±0,14	68
			0,5	0,8±0,04	2,4±0,12
		Стационарная	0,1	0,8±0,04	2,7±0,14
0,5	0,8±0,04		2,4±0,12	63	

Примечание. При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5 %.

Дальнейшие эксперименты показали, что окисление углеводов у *N. vaccinii* IMB В-7405 (как и у исследованных нами ранее штаммов *A. calcoaceticus* IMB В-7241 и *R. erythropolis* IMB Ас-5017) осуществляется трехкомпонентным алкангидроксилазным ком-

плексом, состоящим из растворимой НАДН-рубредоксинредуктазы, растворимого рубредоксина и мембран-связанной монооксигеназы, или алкангидроксилазы (АлкБ). Однако, в отличие от штаммов IMB B-7241 и IMB Ac-5017, алкангидроксилаза *N. vaccinii* IMB B-7405 ингибировалась катионами меди, причем максимальное ингибирование наблюдалось при наличии в реакционной смеси 0,1 мМ Cu^{2+} (рисунок).



Зависимость активности алкангидроксилазы *N. vaccinii* IMB B-7405 от концентрации катионов меди в реакционной смеси

Культивирование осуществляли в среде с *n*-гексадеканом. Активность ферментов определяли в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, находящихся в конце экспоненциальной фазы роста (72 ч).

Исследование влияния различных концентраций катионов меди на активность некоторых ферментов катаболизма глицерина у *N. vaccinii* IMB B-7405 показало, что в присутствии 0,01 мМ Cu^{2+} активность НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы и ПХХ-зависимой глицериндегидрогеназы не изменялась, а при повышении концентрации до 0,05–0,1 мМ снижалась в 1,5 раза по сравнению с таковой без Cu^{2+} (табл. 2). В то же время катионы меди оказались активаторами ФЕП-синтетазы – одного из ключевых ферментов биосинтеза поверхностно-активных гликолипидов *N. vaccinii* IMB B-7405.

Таблица 2

Влияние Cu^{2+} на активность некоторых ферментов катаболизма глицерина и биосинтеза ПАВ у *N. vaccinii* IMB B-7405

Концентрация Cu^{2+} в реакционной смеси, мМ	Активность ферментов, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка		
	НДМА-алкоголь-дегидрогеназа	ПХХ-зависимая глицериндегидрогеназа	ФЕП-синтетаза
0	92±4	43±2	1043±52
0,01	92±4	43±2	1304±65
0,05	61±3	28±1	2435±121
0,10	61±3	28±1	5045±252

Примечание. Активность ферментов определяли в бесклеточном экстракте, полученном из клеток, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста (48 ч).

Различия в степени ингибирования катионами меди ферментов катаболизма углеводов и глицерина у штамма IMB B-7405 (снижение активности алкангидроксилазы в 5 раз, а дегидрогеназ, окисляющих глицерин, всего в 1,5 раза, (см. табл. 2)) и объясняет различное влияние Cu^{2+} на биосинтез ПАВ при культивировании бактерий на *n*-гексадекане, жидких парафинах и глицерине (табл. 1). Повышение синтеза ПАВ при внесении катионов меди в среду с глицерином может быть объяснено их стимулирующим влиянием на активность ФЕП-синтетазы (см. табл. 2). Логично предположить, что в таком случае следовало ожидать и стимуляции синтеза ПАВ на углеводородных субстратах. Однако не исключено, что при культивировании на *n*-гексадекане и жидких парафинах в биосинтезе поверхностно-активных гликолипидов принимает участие другой ключевой фермент глюконеогенеза (ФЕП-карбоксикиназа), чувствительный к действию Cu^{2+} , либо существенное ингибирование алкангидроксилазной реакции (первой реакции катаболизма углеводов) сопровождается снижением активности и дальнейших метаболических реакций.

На следующем этапе исследовали влияние на рост и синтез ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 катионов кадмия и свинца. Токсичное влияние Cd^{2+} на микроорганизмы описано в литературе [14, 18]. Механизм такого действия обусловлен способностью катионов кадмия связываться с сульфидными группами аминокислот (и дальнейшим разрушением структуры белков) или же активными центрами ферментов, что сопровождается потерей их активности [8]. Некоторые бактерии приспособились к существованию в присутствии Cd^{2+} и Pb^{2+} благодаря синтезу протекторных соединений, в том числе и ПАВ [9, 11, 15]. Так, в работах [9, 19] описана способность экзогенно внесенных рамнолипидов образовывать комплексы с катионами этих металлов.

Ранее нами было показано, что добавление катионов кадмия и свинца в невысокой концентрации (0,01 мМ) в среду культивирования *R. erythropolis* IMB Ас-5017 полностью ингибирует рост бактерий и синтез ПАВ (неопубликованные данные). Штамм IMB В-7405 оказал-ся значительно более устойчивым к действию Cd^{2+} и Pb^{2+} (табл. 3).

Таблица 3

Влияние Cd^{2+} и Pb^{2+} на рост и синтез ПАВ при выращивании *N. vaccinii* IMB В-7405 на глицерине

Катионы	Момент внесения (фаза роста)	Концентрация катионов, мМ	Биомасса, г/л	E_{24}^* %	ПАВ*
Cd^{2+}	Экспоненциальная	0	0,81±0,04	69	3,1±0,16
		0,1	0,63±0,03	61	2,5±0,13
		0,2	0,55±0,03	69	1,9±0,09
		0,3	0,4±0,02	64	0,8±0,04
	Стационарная	0,1	0,59±0,03	60	2,3±0,12
		0,2	0,50±0,03	62	2,3±0,12
0,3		0,39±0,02	59	0,6±0,03	
Pb^{2+}	Экспоненциальная	0	0,81±0,04	69	3,1±0,16
		0,1	0,63±0,03	63	2,2±0,11
		0,2	0,57±0,03	56	2,0±0,10
		0,3	0,45±0,02	68	1,1±0,05
	Стационарная	0,1	0,66±0,03	57	2,4±0,12
		0,2	0,61±0,03	64	2,1±0,11
0,3		0,47±0,02	59	0,9±0,04	

Примечание. При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5 %.

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что даже при концентрации катионов кадмия и свинца 0,3 мМ не наблюдали полного угнетения роста и образования ПАВ. Отметим, что при внесении катионов этих металлов в глицеринсодержащую среду индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся. Мы предположили, что определенная устойчивость *N. vaccinii* IMB В-7405 к Cd^{2+} и Pb^{2+} может быть обусловлена защитными функциями ПАВ. Дальнейшие эксперименты подтвердили наше предположение.

Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что клетки из экспоненциальной фазы роста оказались более устойчивыми к действию катионов кадмия, свинца и меди, чем из стационарной. Следовательно, кроме синтеза ПАВ, концентрация которых достигает максимума в стационарной фазе, у *N. vaccinii* IMB В-7405 функционируют и другие адаптивные реакции на действие токсичных металлов. Тем не менее, удаление ПАВ из культуры сопровождалось снижением в несколько раз выживаемости клеток в присутствии катионов Cd^{2+} , Pb^{2+} и Cu^{2+} (табл. 4). Из литературы известно, что липопептиды *Bacillus cereus* NK1 защищают клетки продуцента от действия катионов железа, свинца, цинка и меди: в присутствии ПАВ все клетки после внесения металлов оставались жизнеспособными, в то время как после удаления липопептидов наблюдали гибель практически всех клеток [18]. Защитными функциями обладают и ПАВ бактерий *Bacillus circulans*, выделенных из вод Индийского океана [12]. Показано, что 5 %-ные растворы этих ПАВ удаляли 98, 88 и 87 % Cd^{2+} (100, 500, 1000 мг/л соответственно) и 100, 96 и 88 % Pb^{2+} (100, 500, 1000 мг/л). При действии катионов металлов на лишенные ПАВ клетки наблюдали ингибирование роста бактерий [12].

Поскольку внесение Cu^{2+} в среду культивирования *N. vaccinii* IMB В-7405 с глицерином сопровождалось повышением синтеза ПАВ, обладающих защитными свойствами, предпо-

жили, что токсическое действие Cd^{2+} и Pb^{2+} на клетки бактерий можно снизить при одновременном добавлении катионов меди и кадмия (свинца) в среду. Действительно, в этом случае ингибирования роста штамма ИМВ В-7405 не наблюдали, а при совместном внесении катионов металлов в стационарной фазе роста отмечалось даже повышение показателей синтеза ПАВ по сравнению с таковыми на среде без металлов (табл. 5).

Таблица 4

Роль ПАВ в защите клеток *N. vaccinii* ИМВ В-7405 от действия Cu^{2+} , Cd^{2+} и Pb^{2+}

Фаза роста клеток	Катионы металлов	Концентрация катионов, мМ	Выживаемость, %	
			в присутствии ПАВ	без ПАВ
Экспоненциальная	Cu^{2+}	1,5	45±2,3	29±1,5
		2,0	20±1,0	10±0,5
		2,5	5±0,3	0
	Cd^{2+}	0,1	81±4,1	45±2,25
		0,3	60±3,0	13±0,65
		0,5	19±1,0	0
	Pb^{2+}	0,1	77±3,8	51±2,6
		0,3	45±2,3	39±1,9
		0,5	14±0,7	6±0,3
Стационарная	Cu^{2+}	1,5	23±1,2	10±0,5
		2,0	12±0,6	5±0,25
		2,5	4±0,2	0
	Cd^{2+}	0,1	22±1,1	15±0,75
		0,3	10±0,5	0
		0,5	2±0,1	0
	Pb^{2+}	0,1	36±1,8	11±0,55
		0,3	24±1,2	0
		0,5	12±0,6	0

Примечания. Культивирование осуществляли на среде с глицерином. Выживаемость клеток в контрольных (без металлов) вариантах составляла 100 %.

Таким образом, приведенные в данной работе результаты подтверждают полученные ранее [6] данные о том, что концентрация металла и момент его внесения в среду культивирования может быть фактором интенсификации синтеза микробных ПАВ. Кроме того, представленные данные являются основой для разработки природоохранных технологий с использованием ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 для удаления как тяжелых токсичных металлов, так и комплексных загрязнений, содержащих различные углеводороды и металлы.

Таблица 5

Влияние смеси катионов тяжелых металлов на синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на глицерине

Катионы, момент внесения (фаза роста)	Биомаса, г/л	ПАВ*	E_{242} , %
Без металлов	0,9±0,04	3,0±0,15	53
$Cu^{2+}+Cd^{2+}$, экспоненциальная	0,7±0,03	2,1±0,10	63
Cu^{2+} (экспоненциальная) + Cd^{2+} (стационарная)	0,9±0,04	3,3±0,16	62
$Cu^{2+}+Cd^{2+}$, стационарная	0,95±0,05	3,6±0,18	70
$Cu^{2+}+Pb^{2+}$, экспоненциальная	0,8±0,04	2,8±0,14	57
Cu^{2+} (экспоненциальная) + Pb^{2+} (стационарная)	0,8±0,04	2,1±0,10	59
$Cu^{2+}+Pb^{2+}$, стационарная	0,95±0,05	3,8±0,19	72

Примечания. Концентрация (мМ): Cu^{2+} – 0,1; Cd^{2+} – 0,3; Pb^{2+} – 0,3. При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5 %.

Т.П. Пирог^{1,2}, А. Д. Конон¹, Х.А. Погора¹, Т.А. Шевчук², Г.О. Іутинська²

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

Резюме

Досліджували утворення поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 за внесення Cd²⁺, Pb²⁺ і Cu²⁺ у середовище з вуглеводнями і гліцерином.

Встановлено, що додавання 0,1 мМ Cu²⁺ в експоненційній фазі росту штаму IMV B-7405 на гліцерині або спільне внесення Cu²⁺ (0,1 мМ) і Cd²⁺ (0,3 мМ), Cu²⁺ (0,1 мМ) і Pb²⁺ (0,3 мМ) у стаціонарній фазі супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР на 53 і 20–26 % відповідно порівняно з показниками на середовищі без катіонів металів. Показано, що поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* IMV B-7405 захищають клітини продуцента від дії важких металів. Після видалення ПАР виживання клітин за присутності Cu²⁺ (1,5–2,5 мМ), Cd²⁺ або Pb²⁺ (0,1–0,3 мМ) знижувалося у кілька разів (до 5–45 %).

Встановлено інгібувальну дію Cu²⁺ на активність алкангідроксилази (першого ферменту катаболізму вуглеводнів) і стимулювальну – на активність фосфоенолпіруватсинтетази (ферменту біосинтезу поверхнево-активних гліколіпідів) у *N. vaccinii* IMV B-7405.

К л ю ч о в і с л о в а : поверхнево-активні речовини, важкі метали, захисні функції, біосинтез.

T. P. Pirog^{1,2}, A. D. Konon¹, K. A. Pokora¹, T. A. Shevchuk², G. A. Iutinskaya²

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON SURFACTANTS SYNTHESIS BY *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

Summary

The production of surfactants by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 in glycerol -and hydrocarbon-containing medium after addition Cd²⁺, Pb²⁺ and Cu²⁺ was investigated.

It was established that the introduction of 0.1 mM Cu²⁺ in the exponential growth phase of IMV B-7405 strain or simultaneous addition of Cu²⁺ (0.1 mM) and Cd²⁺ (0.3 mM), Cu²⁺ (0.1 mM) and Pb²⁺ (0.3 mM) in stationary phase was accompanied by the increase of conditional concentration of the surfactant (by 53 and 20–26 %, respectively) compared with indexes in the medium without metals cations.

It was established that the surfactants of *N. vaccinii* IMV B-7405 possessed protective functions from heavy metals influence. After surfactants elimination the survival of cells of strain IMV B-7405 in the presence of Cu²⁺ (1.5–2.5 mM), Cd²⁺ or Pb²⁺ (0.1–0.3 mM) decreased a few times (to 5–45 %).

The inhibition action of Cu²⁺ on alkane hydroxylase activity (the first enzyme of hydrocarbon catabolism) and stimulation – on phosphoenolpyruvate synthetase (enzyme of surface-active glycolipids biosynthesis) in *N. vaccinii* IMV B-7405 have been established.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s : surfactants, heavy metals, protective functions, biosynthesis.

The authors' address: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. Інтенсифікація синтезу поверхностно-активних речовин при культивуванні *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на н-гексадекане // Прикл. біохімія і мікробіологія. – 2010. – 46, № 6. – С. 651–658.
3. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 на отходах производства биодизеля // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 15–23.

4. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец И.В. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на смеси *n*-гексадекана и глицерина // Микробиология. – 2012. – **81**, № 5. – С. 611–618.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Шулякова М.О. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 у середовищі з гліцеролом // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 4. – С. 88–95.
6. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Парфенюк С.А. Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В 7241 и *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 // Микробиол. журн. – 2013. – **75**, № 1. – С. 3–13.
7. Пирог Т.П., Погора К. А., Маценко О.Ю., Шевчук Т.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 на техническом глицерине // Там же. – 2013. – **75**, № 4. – С. 13–22.
8. Aloui A., Recorbet G., Robert F., Schoefs B., Bertrand M., Henry C., Gianinazzi-Pearson V., Dumas-Gaudot E., Aschi-Smiti S. Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits shoot proteome changes that are modified during cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* // BMC Plant Biol. – 2011. – **11**. – doi: 10.1186/1471-2229-11-75.
9. Asci Y., Nurbas M., Sag Acikel Y. Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant // J. Environ. Manag. – 2010. – **91**, N 3. – P. 724–731.
10. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – **87**, N 2. – P. 427–444.
11. Chrzanowski L., Lawniczak L., Czaczuk K.. Why do microorganisms produce rhamnolipids? // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – **28**, N 2. – P. 401–419.
12. Das P., Mukherjee S., Sen R. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties // Bioresur. Technol. – 2009. – **100**, N 20. – P. 4887–4890.
13. de Carvalho C.C. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions // Res. Microbiol. – 2012. – **163**, N 2. – P. 125–136.
14. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // Microbiology. – 2010. – **156**, N 3. – P. 609–643.
15. Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N, Suseela Rajakumar G., Sekaran G., Mandal A.B. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2010. – **79**, N 2. – P. 334–339.
16. Hoffmann T., Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition // J. Bacteriol. – 2011. – **193**, N 7. – P. 1552–1562.
17. Jayabarath J., Sundar S.S., Arulmurugan R., Giridhar R. Bioremediation of heavy metals using biosurfactants // Int. J. Biotechnol. Appl. – 2009. – **1**, N 2. – P. 50–54.
18. Sriram M.I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosept R., Srisakthi K., Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1 // Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2011. – **85**, N 2. – P. 174–181.
19. Van Nostrand J.D., Sowber A.G., Bertsch P.M, Morris P.J. Effect of pH on the toxicity of nickel and other divalent metals to *Burkholderia cepacia* PR1301 // Environ. Toxicol. Chem. – 2005. – **24**, N 11. – P. 2742–2750.

Отримано 17.09.2013