

УДК 759.873.088.5:661.185

А.П. СОФІЛКАНИЧ, асп.  
І.В. КВЯТКІВСЬКА, студ.  
Т.П. ПИРОГ, д-р біол. наук  
Національний університет харчових технологій

## СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* ЕК-1 ЗА ПРИСУТНОСТІ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Встановлено, що *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 здатний рости та синтезувати поверхнево-активні речовини (ПАР) за присутності іонів важких металів. Внесення у середовище з етанолом 0,01 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  в експоненційній фазі росту супроводжувалось підвищенням синтезу ПАР на 36 %. За наявності у середовищі культивування 0,01—0,05 мМ  $\text{Cd}^{2+}$  спостерігали пригнічення росту і синтезу ПАР штамом ЕК-1. Внесення такої самої концентрації  $\text{Pb}^{2+}$  також супроводжувалось інгібуванням росту та синтезу ПАР, проте після пересіву на середовище без металу активізувався синтез метаболітів з емульгувальними властивостями. За присутності 0,01 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  спостерігали повну загибель клітин *R. erythropolis* ЕК-1, позбавлених поверхнево-активних речовин, тоді як за наявності ПАР виживало до 65 % клітин.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, захисні функції, важкі метали, культивування, біоремедіація, резистентність.

It was set that *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 is able to grow and synthesize surface-active substances (SAS) at the presence of ions of heavy metals. The addition into the media with the ethanol of 0,01 mM of  $\text{Cu}^{2+}$  in the exponential phase of growth was accompanied the increase of synthesis of SAS at 36 %. The decreasing of growth and SAS syntheses by ЕК-1 strain was obtained at presence of 0,01—0,05 Mm of  $\text{Cd}^{2+}$  in the nutrition media. The addition of the same concentration of  $\text{Pb}^{2+}$  also lead to the inhibition of growth and synthesis of SAS, however after subculturing on the media without the metal the synthesis of metabolites with emulgative properties. The death of all *R. erythropolis* ЕК-1 cells without SAS was obtained at the presence of 0,01 mM of  $\text{Cu}^{2+}$ , while at presence of SAS survived up to 65 % of cells.

**Key words:** surface-active substances, protective properties, heavy metals, cultivation, bioremediation, resistance.

Установлено, что *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 способен расти и синтезировать поверхностно-активные вещества (ПАВ) в присутствии ионов тяжелых металлов. Внесение в среду с этанолом 0,01 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  в экспоненциальной фазе роста сопровождалось повышением синтеза ПАВ на 36 %. В присутствии в бреде культивирования 0,01—0,05 мМ  $\text{Cd}^{2+}$  наблюдали уменьшение роста и синтеза ПАВ штаммом ЕК-1. Внесение такой же концентрации  $\text{Pb}^{2+}$  также сопровождалось ингибированием роста и синтеза ПАВ, хотя после пересева на среду без металла активизировался синтез метаболитов с эмульгирующими свойствами. В присутствии 0,01 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  наблюдали полную гибель клеток *R. erythropolis* ЕК-1, освобожденных от поверхностно-активных веществ, тогда как в присутствии ПАВ выживало до 65 % клеток.

**Ключевые слова:** поверхностно-активные вещества, защитные свойства, тяжелые металлы, культивирование, биоремедиація, резистентность.

© А.П. Софілканич, І.В. Квятківська, Т.П. Пирог, 2011

## ТЕХНОЛОГІЯ

Завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) знаходять застосування для вирішення ряду практичних завдань, більшість яких пов'язано з усуненням екологічних проблем, що гостро постали перед людством. До них належать забруднення ґрунтів і водою токсичними ксенобіотиками, що загрожує екологічною катастрофою [1].

Літературні дані [1—3] свідчать про важливу фізіологічну роль мікробних поверхнево-активних речовин у несприятливих умовах існування мікроорганізмів. Встановлено, що ПАР надають продуцентам ряд суттєвих переваг завдяки інтенсифікації перенесення поживних речовин у клітину, збільшенню біодоступності гідрофобних субстратів, підвищенню стійкості до важких металів, антимікробним властивостям [3].

Особливу увагу привертає здатність до синтезу ПАР за присутності важких металів, які гальмують процеси біологічного очищення екосистем (біоремедіація), пригнічуючи ріст і розвиток, наприклад вуглеводеньокиснювальних мікроорганізмів [1, 3]. Так, встановлено, що використання продуцентів ПАР для біоремедіації забруднених металами середовищ є ефективнішим порівняно зі штамми, нездатних до синтезу цих сполук. Передбачається, що метаболіти з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями здатні утворювати комплекси із важкими металами, нейтралізуючи їх токсичний вплив на клітини [1, 3].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [4] та депонований в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології за номером ІМВ Ас-5017. Встановлено оптимальні для синтезу ПАР умови культивування штаму ЕК-1 [4], показано можливість використання препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-у вигляді постферментаційної культуральної рідини у процесах очищення води та ґрунту від нафтових забруднень [5].

У природі забруднення часто носять змішаний характер (наприклад, одночасна наявність як вуглеводнів, так і токсичних металів), тому актуальним є вивчення впливу іонів важких металів на біосинтез ПАР.

Мета даної роботи — дослідження впливу токсичних металів ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  та  $\text{Pb}^{2+}$ ) на ріст *R. erythropolis* ЕК-1 і синтез поверхнево-активних речовин, а також дослідження ролі ПАР у захисті клітин від іонів міді.

Культивування бактерій проводили на мінеральному поживному середовищі такогоскладу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 1,3;  $\text{NaCl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001; рН 6,8—7,0. Як джерело вуглецю використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 1 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість інокуляту — 5 % від об'єму поживного середовища. Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 проводили в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °С упродовж 120 год.

Для дослідження впливу важких металів у середовище культивування вносили 0,01 мМ і 0,05 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , і  $\text{Pb}^{2+}$  у вигляді стерильних 1 %-них розчинів солей  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  та  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$  відповідно. Метали вносили на початку процесу культивування, в середині експоненційної, а також на початку стаціонарної фази росту. Після вирощування культуральна рідина слугувала інокулятом (у концентрації 5 %) для засіву поживного середовища з етанолом без металу.

Біомасу визначали за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютноно суху біомасу за калібрувальним графіком.

Рівень синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

1) поверхневий натяг ( $\sigma_s$ , мН/м) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина). Принцип його роботи базується на визначенні сили втягування платинової пластинки, що зумовлена поверхневим натягом рідини;

2) для оцінки кількісного вмісту ПАР в культуральній рідині використовували показник «умовна концентрація ПАР» (ПАР\*), який визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зростання поверхневого натягу на кривій залежності  $\sigma_s$  від логарифму показника розведення. Показник ПАР\* є безрозмірною величиною;

3) індекс емульгування ( $E_{24}$ , %) культуральної рідини визначали так. До 2 мл нерозведеної культуральної рідини додавали 2 мл субстрату для емульгування (соняшникова олія) та

струшували протягом 2 хв.  $E_{24}$  визначали через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках.

Визначення ролі ПАР у захисті клітин штаму ЕК-1 від дії  $\text{Cu}^{2+}$  здійснювали так. Культуральну рідину, отриману після культивування штаму ЕК-1 упродовж 48 год (середина експоненційної фази) та 72 год (початок стаціонарної фази) на середовищі з етанолом, піддавали ультрацентрифугуванню (10000 г, 5 хв). Для відмивання осаджених клітин від залишків поживного середовища їх суспендували у стерильній водопровідній воді і повторно центрифугували (10000 г, 5 хв), після чого ресуспендували у такому самому об'ємі стерильної водопровідної води (суспензія клітин, вільних від ПАР). Далі у пробірки типу erpendorf поміщали по 1,5 мл культуральної рідини (клітини + ПАР) і суспензії клітин, позбавлених ПАР; потім вносили  $\text{Cu}^{2+}$  у концентрації 0,01, 0,05 та 0,1 мМ, витримували у термостаті при 30 °С упродовж 1 год, після чого визначали кількість живих клітин за методом Коха на глюкозо-картопляному агаризованому середовищі.

На першому етапі визначали вплив іонів  $\text{Cu}^{2+}$  на ріст *R. erythropolis* ЕК-1 і синтез поверхнево-активних речовин (табл. 1). Як свідчать наведені у табл. 1 дані, внесення 0,01—0,05 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  на початку процесу культивування *R. erythropolis* ЕК-1 супроводжувалось пригніченням росту та синтезу поверхнево-активних речовин. Ймовірно, це зумовлено надзвичайно низькою концентрацією ПАР на початку культивування, а отже більшою чутливістю клітин до дії металу, хоча внесення  $\text{Cu}^{2+}$  у досліджуваних концентраціях не призводило до повної загибелі культури, оскільки синтез повністю ПАР не припинявся. Внесення катіонів міді у концентрації 0,01 мМ на 48 год культивування (середина експоненційної фази) супроводжувалось підвищенням умовної концентрації ПАР на 36 % порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без  $\text{Cu}^{2+}$ . Це може бути пов'язано з тим, що у середині експоненційної фази росту клітини перебувають у метаболічно активному стані і при контакті з токсичним металом активізується синтез ПАР. Проте вища концентрація  $\text{Cu}^{2+}$  (0,05 мМ) у експоненційній фазі пригнічувала утворення поверхнево-активних речовин.

**Таблиця 1. Вплив  $\text{Cu}^{2+}$  на ріст *R. erythropolis* ЕК-1 і синтез поверхнево-активних речовин**

Момент внесення $\text{Cu}^{2+}$ , год	Концентрація $\text{Cu}^{2+}$ , мМ	Біомаса, г/л	ПАР*	Індекс емульгування, ( $E_{24}$ ), %
контроль	0	0,75 ± 0,035	4,1 ± 0,20	43 ± 2,2
0	0,01	0,18 ± 0,009	1,9 ± 0,09	40 ± 2,0
	0,05	0,13 ± 0,006	1,8 ± 0,09	41 ± 2,0
48	0,01	0,25 ± 0,012	5,6 ± 0,28	47 ± 2,9
	0,05	0,55 ± 0,028	2,8 ± 0,14	39 ± 1,7
72	0,01	0,67 ± 0,03	2,8 ± 0,14	45 ± 2,3
	0,05	0,90 ± 0,04	3,1 ± 0,15	41 ± 2,0

Зазначимо, що незалежно від моменту внесення і концентрації катіонів міді індекс емульгування культуральної рідини суттєво не змінювався і перебував у межах 40—47 % (табл. 1).

На наступному етапі здійснювали пересів усіх варіантів на середовище без металу (табл. 2). Як видно з наведених у табл. 2 даних, практично для всіх досліджуваних варіантів пересів на середовище без  $\text{Cu}^{2+}$  супроводжувався підвищенням рівня біомаси порівняно з вирощуванням за присутності катіонів міді, у той час як умовна концентрація ПАР знижувалася, а індекс емульгування суттєво не змінювався (див. табл. 1 і 2).

Отже, за внесення 0,01 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  в експоненційній фазі росту *R. erythropolis* ЕК-1 показник умовної концентрації ПАР підвищувався, проте після пересіву на середовище без металу спостерігали зниження синтезу ПАР.

## ТЕХНОЛОГІЯ

**Таблиця 2. Показники росту і синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 після пересіву на середовище без  $\text{Cu}^{2+}$**

Варіант обробки $\text{Cu}^{2+}$		Біомаса, г/л	ПАР*	Індекс емульгування (Е24), %
Момент внесення	Концентрація $\text{Cu}^{2+}$ , мМ			
контроль	0	0,75 ± 0,035	4,1 ± 0,20	43 ± 2,2
0	0,01	0,29 ± 0,014	2,0 ± 0,10	40 ± 2,0
	0,05	0,11 ± 0,005	0	34 ± 1,7
48	0,01	0,55 ± 0,027	2,6 ± 0,13	41 ± 2,0
	0,05	0,67 ± 0,033	3,2 ± 0,16	42 ± 2,1
72	0,01	0,80 ± 0,040	2,8 ± 0,14	41 ± 2,0
	0,05	1,0 ± 0,05	2,9 ± 0,14	40 ± 2,0

Наступні аналогічні дослідження, проведені із  $\text{Cd}^{2+}$  та  $\text{Pb}^{2+}$ , продемонстрували токсичний вплив даних металів у досліджуваних концентраціях на *R. erythropolis* ЕК-1. Так, після внесення у середовище катіонів як кадмію, так і свинцю не спостерігали росту бактерій і синтезу ПАР. Після пересіву культури, обробленої  $\text{Pb}^{2+}$  (0,01—0,05 мМ), на середовище без металу ріст бактерій (але не синтез ПАР) відновлювався. Цікаво зазначити, що у цьому разі спостерігали інтенсифікацію синтезу метаболітів з емульгувальними властивостями, про що засвідчило підвищення індексу емульгування (табл. 3). Найвищі емульгувальні властивості були притаманні культуральній рідині, отриманій після пересіву культури, обробленої 0,01 і 0,05 мМ  $\text{Pb}^{2+}$  в експоненційній фазі росту: показник  $E_{24}$  становив 57 і 65 % відповідно (табл. 3).

**Таблиця 3. Показники росту і синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 після пересіву на середовище без  $\text{Pb}^{2+}$**

Варіант обробки $\text{Pb}^{2+}$		Біомаса, г/л	Індекс емульгування, (Е24), %
Момент внесення	Концентрація $\text{Pb}^{2+}$ , мМ		
контроль	0	0,75 ± 0,045	43 ± 2,01
0	0,01	0,67 ± 0,015	45 ± 1,0
	0,05	0,6 ± 0,07	49 ± 1,4
48	0,01	0,55 ± 0,05	57 ± 0,5
	0,05	0,52 ± 0,015	65 ± 1,5
72	0,01	0,57 ± 0,1	56 ± 1,0
	0,05	0,7 ± 0,07	55 ± 1,3

У разі пересіву клітин *R. erythropolis* ЕК-1, оброблених катіонами кадмію, на середовище без  $\text{Cd}^{2+}$ , не спостерігали відновлення росту і синтезу метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями.

Проведені раніше дослідження захисних функцій мікробного екзополісахариду етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) щодо важких металів показали, що виживання клітин за присутності етаполану було вищим у 3—10 разів, ніж звільнених від екзополісахариду клітин [6]. Так, наприклад, при додаванні до культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 3,0—5,0 мМ  $\text{Cr}^{3+}$  чи 2,0—5,0  $\text{Pb}^{2+}$  практично всі клітини залишалися життєздатними. Підвищення концентрації  $\text{Cr}^{3+}$  до 7,0 мМ призводило до загибелі 20 % клітин. Однак після вилучення екзополісахариду

кількість життєздатних клітин за присутності хрому знижувалась на 80—95, а свинцю — на 55—60 %. Ми припускаємо, що захисна роль поверхнево-активних речовин аналогічна дії екзополісахаридів і полягає у здатності цих сполук утворювати комплекси з металами [6].

Для перевірки цього припущення на наступному етапі визначали стійкість до  $\text{Cu}^{2+}$  клітин *R. erythropolis* ЕК-1 за присутності ПАР та клітин, позбавлених поверхнево-активних речовин. Оскільки «відповідь» на присутність катіонів міді клітин *R. erythropolis* ЕК-1 з експоненційної та стаціонарної фази росту була різною (див. табл. 1), у даних дослідженнях аналізували роль ПАР у захисті від дії металу клітин різного фізіологічного стану (табл. 4).

Наведені у табл. 4 дані засвідчують захисні функції поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1: незалежно від концентрації катіонів міді спостерігали загибель усіх клітин, позбавлених ПАР, у той час як за присутності ПАР виживання клітин становило від 0,38 до 63,4 %. Рівень виживання клітин штаму ЕК-1 за наявності ПАР після обробки  $\text{Cu}^{2+}$  корелював з концентрацією катіонів міді: у міру збільшення вмісту міді від 0,01 до 0,1 мМ виживання клітин з експоненційної фази росту знижувалося з 63,4 до 0 %, а із стаціонарної — від 53,2 до 0,38 % відповідно. Загалом, стійкішими до дії  $\text{Cu}^{2+}$  за присутності ПАР виявилися клітини із стаціонарної фази росту, що можна пояснити вищою концентрацією синтезованих поверхнево-активних речовин.

Таблиця 4. Роль поверхнево-активних речовин у захисті *R. erythropolis* ЕК-1 від  $\text{Cu}^{2+}$

Тривалість культивування, год	Концентрація $\text{Cu}^{2+}$ , мМ	Виживання клітин, %	
		за присутності ПАР	без ПАР
48	0	95±5	95±5
	0,01	63,4±3,1	0
	0,05	0,54±0,03	0
	0,1	0	0
72	0	95±5	95±5
	0,01	53,2±2,6	0
	0,05	23,2±1,1	0
	0,1	0,38±0,02	0

Примітки. Умовна концентрація ПАР після 48 і 72 год культивування становила  $1,1\pm 0,05$  і  $1,7\pm 0,08$ ; рівень біомаси —  $0,32\pm 0,016$  і  $0,55\pm 0,027$  г/л відповідно. Тривалість експозиції за присутності катіонів міді — 1 год.

**Висновки.** Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що внесення 0,01—0,05 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  у середовище культивування *R. erythropolis* ЕК-1 стимулює утворення метаболітів з поверхнево-активними ( $\text{Cu}^{2+}$ ) і емульгуювальними властивостями ( $\text{Pb}^{2+}$ ). Показано, що клітини *R. erythropolis* ЕК-1 за присутності ПАР є стійкими до дії  $\text{Cu}^{2+}$  у концентрації 0,01—0,1 мМ, причому вища резистентність притаманна культурі із стаціонарної фази росту.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Mulligan C.N. Environmental applications for biosurfactants // Environ. Pollution. — 2005. — Vol. 133. — P. 183—198.
2. Cameotra S.S., Makkar R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions // Microbiol. Biotechnol. — 1998. — Vol. 50. — P. 520—529.
3. van Hamme J., Singh A., Ward O.P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology // Biotechnol. Adv. — 2006. — Vol. 24. — P. 604—620.
4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и

## ТЕХНОЛОГІЯ

гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 544—550.

5. Морозова А.П., Пирог Т.П., Антонюк С.И. Влияние поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на эффективность микробной деструкции нефтяных загрязнений // Мат-лы Межд. научн. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (31 мая—4 июня 2010 г., Минск, Беларусь). — С. 372—374.

6. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.

*Одержана редколегією 22.02.11 р.*