

The protective function of *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405 surfactants

Kateryna Panasiuk

National University of food technologies, Kyiv, Ukraine

ABSTRACT

Keywords:

Nocardia vaccinii
IMB B-7405
Heavy metals
Protective

Article history:

Received 05.08.2013
Received in revised
form
18.10.2013
Accepted 25.12.2013

Corresponding author:

Kateryna Panasiuk
E-mail:
katia.panasyu@mail.ru

Introduction. Purpose is investigate the ability of substances of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 to protect producer's cells from the effects of Cu^{2+} (1,5-2,5 mM), Cd^{2+} (0,1-0,5 mM) and Pb^{2+} (0,1-0,5 mM).

Materials and methods. The cultivation of *N. vaccinii* IMB B-7405 was carried out in liquid mineral medium with glycerol (1,5% volume fraction). To determine the protective properties of surfactants in eppendorf tubes type brought to 1.5 ml of culture broth (cells + surfactants) and the cell suspension without surfactant, was added 0,1-2,5 mM Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} in a 0,1 M solution salts $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$ and 1 hour of live cells was determined by the method of Koch.

Results and discussion. It was found that substances of *N. vaccinii* IMB B-7405 protect cells of produser from the toxic effects of Cu^{2+} (1,5-2,5 mM), Cd^{2+} (0,1-0,5 mM) and Pb^{2+} (0,1-0,5 mM). Thus, in the presence of 1.5-2.0 mM Cu^{2+} cell's survival of the strain IMV B-7405 from the exponential phase was 20-45%, when from the stationary phase was in 1,7-2,0 times lower. By the action of 0,1 mM Cd^{2+} and Pb^{2+} on cells of *N. vaccinii* IMB B-7405 from the exponential growth phase in the presence of substances survived in 1,5-1,8 times more cells than without surface-active substances. It is established the protective properties of the surfactant *N. vaccinii* IMB B-7405 from the effect of heavy metals on the producer cells. The results can serve as a basis for environmental technologies for remediation of heavy metal complex of oil pollution.

УДК 759.873.088.5:661.185

Захисні функції поверхнево-активних речовин *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405

Катерина Панасюк

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ

Потужне техногенне навантаження на навколишнє середовище упродовж останніх років робить проблему очищення біосфери від ксенобіотиків досить

нагальною. Забруднення важкими металами негативно впливає на довкілля, а також може загрожувати здоров'ю людини [1]. Останнім часом найбільшого поширення набула проблема забруднення металами водних середовищ, серед яких найбільшу небезпеку представляють стічні води, оскільки належного способу їх очищення не розроблено [1].

Традиційні технології обробки забруднених стічних вод (хімічне осадження, коагуляція, іонний обмін, зворотній осмос та екстракція розчинниками) є економічно не вигідними і мають ряд недоліків: швидкий вихід використовуваного обладнання з експлуатації, утворення токсичного мулу тощо.

На сьогоднішній день одними із ефективних методів очищення довкілля від важких металів є біологічні, основані на використанні мікроорганізмів і продуктів їхньої життєдіяльності, зокрема поверхнево-активних речовин (ПАР) [2, 3].

Поверхнево-активні речовини є об'єктом багатьох досліджень, проте їхнє значення для мікроорганізмів-продуцентів (фізіологічна роль ПАР) залишається не достатньо дослідженим [4, 5]. Так відомо, що ПАР емульгують вуглеводні та полегшують їх транспорт у клітину, їм притаманні антимікробні та антиадгезивні властивості, а також беруть участь в утворенні біоплівки. Крім того, вони здатні утворювати стабільні комплекси з важкими металами, захищаючи таким чином клітини продуцента від їх токсичної дії [4, 6].

Нині детально досліджено здатність рамноліпідів, софороліпідів, сурфактину та інших ліпопептидів сприяти ефективному очищенню забруднених металами ґрунтів [7, 8]. Крім того, поверхнево-активні речовини можуть додаватися в промивні води для підвищення солюбілізації та десорбції металів [8].

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту був виділений штам нафтоокислювальних бактерій *Nocardia vaccinii* K-8 [9], депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером IMB B-7405. Встановлено здатність цього штаму синтезувати сполуки з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни) та гідрофільних (глюкоза, етанол, гліцерин) субстратах [10].

Раніше було встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 захищають клітини продуцентів від дії Cu^{2+} (0,01–0,5 мМ) та Cd^{2+} (0,1 мМ), тоді як за додавання 0,1 мМ Pb^{2+} всі клітини гинули навіть за наявності ПАР [11].

Метою даної роботи було дослідження здатності ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 захищати клітини продуцентів від впливу Cu^{2+} (1,5–2,5 мМ), Cd^{2+} (0,1–0,5 мМ) і Pb^{2+} (0,1–0,5 мМ).

Матеріали та методи

Культивування бактерій здійснювали на середовищі наступного складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaNO_3 – 0,5. У середовище культивування додатково вносили $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 г/л. Як джерело вуглецю і енергії використовували гліцерин у концентрації 1,5 % (об'ємна частка), додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру із середини експоненційної фази росту (48–60 год), вирощений на середовищі вищевказаного складу з 0,5 % (об'ємна частка) гліцерину. Кількість інокуляту – 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 30 °C упродовж 72 год.

Визначення ролі ПАР у захисті клітин від дії Cu^{2+} , Cd^{2+} та Pb^{2+} здійснювали так. Культуральну рідину, отриману після культивування штаму ІМВ В-7405 до середини експоненційної фази та стаціонарної фази піддавали ультрацентрифугуванню (10000 g, 5 хв). Для відмивання осаджених клітин від залишків поживного середовища їх суспендували у стерильній водопровідній воді і повторно центрифугували (10000 g, 5 хв), після чого ресуспендували у такому самому об'ємі стерильної водопровідної води (суспензія клітин, вільних від ПАР). Далі у пробірки типу erpendorf вносили по 1,5 мл культуральної рідини (клітини + ПАР) і суспензії клітин, позбавлених ПАР; додавали 1,5–2,5 мМ Cu^{2+} , 0,1–0,5 мМ Cd^{2+} або 0,1–0,5 мМ Pb^{2+} у вигляді 0,1 М розчинів солей $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ і $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \times 3\text{H}_2\text{O}$, витримували у термостаті при 30 °С упродовж 1 год, після чого визначали кількість живих клітин за методом Коха на глюкозо-картопляному агарі (ГКА).

Результати та обговорення

Ступінь виживання клітин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежно від концентрації металів за присутності ПАР і без них наведено у таблиці.

Вплив поверхнево-активних речовин на виживання клітин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за присутності Cu^{2+} , Cd^{2+} та Pb^{2+}

Фаза росту клітин	Катіони	Концентрація, Мм	Виживання клітин, %	
			За присутності ПАР	Без ПАР
Контроль (без металу)		—	100±5,0	100±5,0
Експоненційна	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±2,3
		0,3	60±3,0	13±0,7
		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
Стаціонарна	Cu ²⁺	1,5	23±1,2	10±0,5
		2,0	12±0,6	5±0,3
		2,5	4±0,2	0
	Cd ²⁺	0,1	22±1,1	15±0,8
		0,3	10±0,5	0
		0,5	2±0,1	0
	Pb ²⁺	0,1	36±1,8	11±0,6
		0,3	24±1,2	0
		0,5	12±0,6	0

Встановлено, що виживання клітини *N. vaccinii* ІМВ В-7405 при дії катіонів металів залежало від фази росту продуцента. Так, за присутності ПАР і 1,5 мМ Cu^{2+} , 0,1–0,3 мМ Cd^{2+} і Pb^{2+} виживало на 29–89 % більше клітин з експоненційної фази росту, ніж зі стаціонарної.

Показано, що ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 захищають клітини продуцента від токсичного впливу катіонів важких металів (таблиця). Так, за внесення 1,5–2,0 мМ Cu^{2+} і ПАР виживало на 10–16 % більше клітин штаму IMB B-7405, ніж без поверхнево-активних речовин. За додавання 0,1–0,3 мМ Cd^{2+} і Pb^{2+} в суспензію клітин *N. vaccinii* IMB B-7405, що містить ПАР, виживало до 45–81 % клітин, тоді як після видалення ПАР – всього 13–45 %.

Внесення більш високих (0,5 мМ) концентрацій Cd^{2+} і Pb^{2+} супроводжувалося загибеллю всіх клітин *N. vaccinii* IMB B-7405, позбавлених ПАР, тоді як за присутності поверхнево-активних речовин виживало до 19 % клітин.

Зазначимо, що клітини *N. vaccinii* IMB B-7405 витримували вищі концентрації Cu^{2+} (1,5–2,5 мМ), ніж клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (0,5 мМ) і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (0,01 мМ) [11, 12].

Вживання клітин *N. vaccinii* IMB B-7405 за присутності ПАР після обробки катіонами металами знижувалася в міру збільшення концентрації катіонів міді, кадмію і свинцю. Однак більш стійкими до дії всіх досліджуваних металів виявилися клітини з експоненційної фази росту, що можна пояснити функціонуванням у них інших адаптивних механізмів, крім синтезу ПАР.

Аналогічні дослідження були проведені з ЕПС етаполаном, синтезованим *Acinetobacter* sp. [14]. Показано, що етаполан захищав клітини продуцента від впливу Cr^{3+} і Pb^{2+} . Так, вживання клітин за присутності етаполану було вищим у 3–10 разів, ніж клітин звільнених від ЕПС [14]. Наприклад, при додаванні в культуральну рідину *Acinetobacter* sp. 3,0 і 5,0 мМ Cr^{3+} чи 2,0–5,0 мМ Pb^{2+} практично всі клітини залишалися життєздатними. Підвищення концентрації Cr^{3+} до 7,0 мМ приводило до загибелі 20 % клітин. Однак після вилучення ЕПС кількість життєздатних клітин за присутності хрому знижувалась на 80–95 %, свинцю – на 55–60 % [14].

Відомо, що поверхнево-активні речовини можуть захищати від токсичного впливу металів не тільки клітини продуцента, але і, наприклад, природну нафтоокиснюючу мікрофлору [15]. Так, раніше було виділено два морфотипа клітин нативної мікрофлори води, які використовували для вивчення захисних функцій ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від токсичного впливу катіонів міді. Встановлено, що вживання клітин обох культур у суспензіях, що містили 0,01 мМ міді та поверхнево-активні речовини досягало 100 %, у суспензіях без ПАР виживало 59 і 4 % клітин типу 1 та 2 відповідно. Внесення 0,05 мМ міді у суспензію культури типу 1 супроводжувалося загибеллю 55 % клітин як у присутності ПАР, так і без них. При додаванні 0,05 мМ міді до суспензії культури типу 2 та поверхнево-активних речовин виживало 76 % клітин, тоді як без ПАР майже усі клітини гинули.

Показано, що препарати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 є ефективними деструкторами нафти у воді (2,6 г/л) за присутності катіонів міді (0,01–0,05 мМ). Один із механізмів біоремедіації комплексних забруднень у воді полягає у захисних функціях поверхнево-активних речовин як по відношенню до клітин-продуцента, так і нативної мікрофлори води [15]. Враховуючи це, а також високу ефективність використання культуральної рідини *N. vaccinii* IMB B-7405, що містить ПАР, для деструкції нафти у воді та ґрунті [16], ми припустили можливість застосування ПАР штаму IMB B-7405 для розкладання комплексних з важкими металами нафтових забруднень. Вивченню цього питання, а також дослідженню захисних властивостей ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 щодо клітин нативної мікрофлори води, будуть присвячені наші подальші дослідження.

В результаті проведених досліджень встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405, захищали клітини продуцента від дії

Cu^{2+} , Cd^{2+} та Pb^{2+} . Слід зазначити, що стійкість клітин до дії катіонів металів залежала від фази росту штаму. Так, виживання клітин штаму IMB B-7405 було вищим у експоненційній фазі росту. Раніше [14] аналогічні результати було отримано при дослідженні захисних функцій мікробного екзополісахариду етаполану та поверхнево-активних речовин штаму ЕК-1.

Висновки

1. Поверхнево-активні речовини, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405, захищають клітини продуцента від токсичного впливу катіонів Cu^{2+} (1,5–2,5мМ) і Cd^{2+} або Pb^{2+} (0,1–0,5мМ).
2. За присутності ПАР виживання клітин *N. vaccinii* IMB B-7405 було на 10 – 47% вищим, ніж без ПАР.

Література

1. Malik A. (2004), Metal bioremediation trough growing cells, *Environ. Int.*, Vol. 30 № 9, P. 261–278.
2. Gadd G.M. (2010), Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation, *Microbiology*. Vol. 156 № 3, P. 609–643.
3. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. (2001), Heavy metal removal from sediments by biosurfactants, *J. Hazard. Mater.* Vol. 85 № 1–2, P. 111–120.
4. Ron E. Z. (2001), Natural roles of biosurfactants, *Environ. Microbiol.* V. 3 № 4, P. 229–36.
5. Jayabarath J. (2009), Bioremediation of heavy metals using biosurfactants, *Biotechnol.* V. 1 №2, P. 50–54.
6. Rehman A. (2011), Heavy metals uptake by *Euglena proxima* isolated from tannery effluents and its potential use in wastewater treatment, *J. Environ. Health. Sci. Eng.*, V. 42 №5, P. 44–49.
7. Łodyga-Chruciska E. (2010), Biosorption of heavy metals – modern and cheap method of polluted wastewater treatment, *J. Agric. Food. Chem.*, V. 74 №7, P. 99–106.
8. Franzetti A. (2010), Applications of biological surface active compounds in remediation technologies, *Adv. Exp. Med. Biol.*, V. 672 № 11, P. 121–134.
9. Пирог Т.П. (2005), Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти, *Прикл. биохимия и микробиология.*, Т. 41 № 1, С. 58–63.
10. Пирог Т.П. (2011), Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля, *Микробиол. журнал*, Т. 73 № 4, С. 15–24.
11. Пирог Т.П., Конон А. Д., Софилканич А.П., Шевчук Т.А., Парфенюк С.А. (2013), Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Микробиол. журнал.*, Т. 75 № 1, С. 3–13.
12. Філюк І.В., Софилканич А.П., Пирог Т.П. (2012), Захисні функції поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Харчова промисловість.*, Т.2 № 10–11, С.121–126.
13. Ahalya N., Ramachandra T.V. and Kanamadi R.D. (2003), Biosorption of heavy metals, *J. Chemist.*, Vol.7 № 4., P. 36–48.

14. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp. : автореф. дис. на здобуття ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Т.П. Пирог. – Київ, 1999. – 36 с.
15. Софілканич А. П. Розробка технології поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 з використанням промислових відходів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / А. П. Софілканич. –К., 2012. – 24 с.
16. Гриценко Н. А. Розробка технології поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* К-8: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Н. А. Гриценко. –К., 2012. – 24 с.

References

1. Malik A. (2004), Metal bioremediation through growing cells, *Environ. Int.*, 30(9), pp. 261–278.
2. Gadd G.M. (2010), Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation, *Microbiology*, 156(3), pp. 609–643.
3. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. (2001), Heavy metal removal from sediments by biosurfactants, *J. Hazard. Mater.*, 85(1–2), pp. 111–120.
4. Ron E. Z. (2001), Natural roles of biosurfactants, *Environ. Microbiol.*, 3(4), pp. 229–36.
5. Jayabarath J. (2009), Bioremediation of heavy metals using biosurfactants, *Biotechnol.*, 1(2), pp. 50–54.
6. Rehman A. (2011), Heavy metals uptake by *Euglena proxima* isolated from tannery effluents and its potential use in wastewater treatment, *J. Environ. Health. Sci. Eng.*, V. 42(5), pp. 44–49.
7. Łodyga-Chruciska E. (2010), Biosorption of heavy metals – modern and cheap method of polluted wastewater treatment, *J. Agric. Food. Chem.*, 74(7), pp. 99–106.
8. Franzetti A. (2010), Applications of biological surface active compounds in remediation technologies, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 672(11), pp. 121–134.
9. Pirog T.P. (2005), Ispol'zovanie immobilizovannykh na keramzite kletok nefteokislyayushchikh mikroorganizmov dlya ochistki vody ot nefi, *Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya*, 41(1), pp. 58–63.
10. Pirog T.P. (2011), Optimizatsiya sinteza poverkhnostno-aktivnykh veshchestv *Nocardia vaccinii* К-8 pri biokonversii otkhodov proizvodstva biodizelya, *Mikrobiol. zhurnal*, 73(4), pp. 15–24.
11. Pirog T.P., Konon A. D., Sofilkanich A.P., Shevchuk T.A., Parfenyuk S.A. (2013), Vliyanie Cu²⁺ na sintez poverkhnostno-aktivnykh veshchestv *Acinetobacter calcoaceticus* IMV V-7241 i *Rhodococcus erythropolis* IMV As-5017, *Mikrobiol. zhurnal.*, 75(1), pp.3–13.
12. Filiuk I.V., Sofylkanych A.P., Pyroh T.P. (2012), Zakhysni funktsii poverkhnevo-aktyvnykh rechovyh *Rhodococcus erythropolis* IMV As-5017 i *Acinetobacter calcoaceticus* IMV V-7241, *Kharchova promyslovist*, 2(10–11), pp. 121–126.
13. Ahalya N., Ramachandra T.V. and Kanamadi R.D. (2003), Biosorption of heavy metals, *J. Chemist.*, 7(4), pp. 36–48.
14. Pyroh T.P. (1999), Pryntsypy rehuliyatsii skladu i fizyko-khimichnykh vlastyvostei ekzopolisakharydiv, syntezovanykh *Acinetobacter* sp, Phd thesis, Kyiv.
15. Sofilkanich A. P. (2012), Rozrobka tekhnolohii poverkhnevo-aktyvnykh rechovyh *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 z vykorystanniam promyslovykh vidkhodiv, Phd thesis Kyiv.
16. Hrytsenko N. A. (2012), Rozrobka tekhnolohii poverkhnevo-aktyvnykh rechovyh *Nocardia vaccinii* К-8, Phd thesis, Kyiv.