

УДК 759.873.088.5:661.185

І.В. Філюк, магістр
А.П. Софілканич, асп.
А.Д. Конон, асп.
С.А. Парфенюк, студ.
Т.П. Пирог, д-р біол. наук
Національний університет
харчових технологій

ЗАХИСНІ ФУНКЦІЇ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017 І *ACINETOBACTER* *CALCOACETICUS* IMB B-7241

Встановлено, що поверхнево-активні речовини (ПАР), синтезовані *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 здатні захищати як клітини продуцентів, так і природної нафтоокиснювальної мікрофлори від токсичного впливу катіонів міді (0,01—0,5 мМ). Так, за присутності 0,01 мМ Cu^{2+} спостерігали повну загибель клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017, позбавлених поверхнево-активних речовин, тоді як за наявності ПАР виживало до 65 % клітин. При дії 0,5 мМ катіонів міді на клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виживало 32 % клітин за наявності ПАР, у той час як без ПАР усі клітини гинули. Виживання клітин нативної нафтоокиснювальної мікрофлори води за присутності катіонів міді та ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 становило 100 %, в той час як без ПАР спостерігали їх повну загибель. Встановлено залежність виживання клітин штаму IMB Ac-5017 за дії катіонів міді від фізіологічного стану.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, захисні функції, катіони міді, виживання клітин.

У попередніх дослідженнях із забрудненого нафтою ґрунту виділено штами нафтоокиснювальних бактерій *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, здатні синтезувати поверхнево-активні речовини [1]. Було показано, що використання препаратів ПАР штамів IMB Ac-5017 і IMB B-7241 у вигляді постферментаційної культуральної рідини є ефективним для очищення води і ґрунту від нафти за присутності катіонів міді [2]. Встановлено можливість інтенсифікації синтезу ПАР даними штамми внесенням у середовище культивування з різними субстратами Cu^{2+} (0,01—0,1 мМ) [3].

Літературні дані [4] 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. Так, ПАР здатні утворювати стабільні комплекси з важкими металами (Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} та Cd^{2+}), захищаючи таким чином клітини продуцента від їх токсичної дії [4].

Відомо, що у відповідь на несприятливі фактори навколишнього середовища у деяких мікроорганізмів спостерігається підвищення синтезу протекторних сполук (білків, екзополісахаридів), що виконують захисну функцію [5]. Наприклад, *Bacillus subtilis* за зниження температури до 15 °C починає синтезувати велику кількість білків, багатих на гліцин і пролін [6]. *Rhodococcus erythropolis* за екстремальних температур (4—20 °C), рН (3, 11), солоності (до 7,5 % хлориду натрію) і наявності 1 % сульфату міді утворює поліненасичені жирні кислоти, синтез яких відсутній за сприятливих умов [7]. У літературі описано психрофільний штам *Rhodococcus* sp. — продуцент ПАР, оптимальною температурою росту якого

© Філюк І.В., Софілканич А.П., Парфенюк С.А., Пирог Т.П., 2012

є 30 °C [8], зниження температури культивування даного штаму до 20 °C супроводжувалось зменшенням рівня біомаси, однак при цьому спостерігали збільшення синтезу ПАР [8]. У роботі [9] описані бактерії *Caenorhabditis elegans*, які за умов гіпертонічного стресу (експозиція впродовж 4 год з 400—500 мМ NaCl) починають синтезувати на 55—120 % більше білків, ніж за нормальних умов. Окремі штами *E. coli* за наявності металів синтезують особливі протекторні білки, що зв'язують метали, штами нездатні до синтезу цих білків за аналогічних умов гинуть [10]. Бактерії *P. aeruginosa* в анаеробних умовах гинуть, проте за додавання екзогенних поверхнево-активних рамноліпідів вони відновлюють свій ріст [11].

Передбачається, що одним з механізмів підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за наявності Cu^{2+} є функціонування аналогічного адаптаційного механізму для захисту клітин від несприятливих факторів навколишнього середовища в тому числі і катіонів міді [8].

Мета даної роботи — дослідження захисних функцій ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 щодо катіонів міді.

Об'єкти дослідження — штами *R. erythropolis* EK-1 і *A. calcoaceticus* K-4, депоновані в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології під номерами IMB Ac-5017 і IMB B-7241 відповідно [1].

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснювали на мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3, NaCl — 1,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, вода дистильована — до 1 л, pH 6,8—7,0.

A. calcoaceticus IMB B-7241 вирощували на середовищі такого ж складу за виключенням джерела азоту: замість NaNO_3 в середовище вносили $(\text{NH}_4)_2\text{CO}$ в концентрації 0,35 г/л. Додатково додавали дріжджовий автолізат — 0,5 % (по об'єму) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка [1]).

Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Посівний матеріал — культура з експоненційної фази росту, вирощена на середовищі наведеного складу з 1 % (по об'єму) етанолу. Кількість інокуляту — 5 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій проводили в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °C упродовж 48—120 год.

Визначення ролі ПАР у захисті клітин від дії Cu^{2+} здійснювали так. Культуральну рідину, отриману після культивування штамів до середини експоненційної та початку 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 поміщали по 1,5 мл культуральної рідини (клітини + ПАР) і суспензії клітин, позбавлених ПАР; потім вносили 0,01—1 мМ Cu^{2+} у вигляді розчину солі $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, витримували у термостаті при 30 °C упродовж 1 год, після чого визначали кількість живих клітин за методом Коха на глюкозо-картопляному (ГКА) чи м'ясо-пептонному агаризованому середовищі (МПА) для штаму IMB Ac-5017 і IMB B-7241 відповідно.

Мікроорганізми нафтоокиснювальної мікрофлори з буювотної води виділяли висівом на МПА, вирощували упродовж двох діб, після чого змивали із скошеного агару стерильною водопровідною водою (контроль) або стерильним супернатантом культуральної рідини після вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017. Супернатант отримували центрифугуванням культуральної рідини (5000 об/хв, 30 хв). В одержані суспензії вносили Cu^{2+} (0,01—0,05 мМ) у вигляді 1 М розчину солі $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Початкову концентрацію клітин у суспензіях встановлювали за мето-

дом Коха. Усі зразки витримували у термостаті впродовж 30 хв при температурі 30 °С, потім визначили кількість живих клітин на МПА за методом Коха.

Залежність виживання клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 від наявності поверхнево-активних речовин і концентрації катіонів міді наведена у табл. 1—2.

Таблиця 1. Роль поверхнево-активних речовин у захисті клітин штаму IMB Ac 5017 від Cu^{2+}

Момент внесення Cu^{2+} (фаза росту)	Концентрація Cu^{2+} , мМ	Вживання клітин, %	
		За присутності ПАР	Без ПАР
Експоненційна	0	95±5	95±5
	0,01	63,4±3,1	0
	0,05	0,54±0,03	0
	0,1	0	0
Стаціонарна	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

Таблиця 2. Вплив поверхнево-активних речовин на виживання клітин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за присутності Cu^{2+}

Концентрація Cu^{2+} , мМ	Вживання клітин, %	
	За присутності ПАР	Без ПАР
0	95±5	95±5
0,1	55±9	50±10
0,5	32±1,6	0
1	0	0

Примітка. Метал вносили у суспензію клітин із експоненційної фази росту.

За додавання 0,1—1 мМ Cu^{2+} у суспензію клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017 як з експоненційної так і стаціонарної фази росту усі клітини гинули, тому у подальшому для штаму IMB Ac-5017 концентрацію катіонів міді зменшили у 10 разів (табл. 1). Наведені у табл. 1 дані свідчать, що незалежно від концентрації Cu^{2+} спостерігали загибель усіх клітин штаму IMB Ac-5017, позбавлених ПАР, у той час як за присутності ПАР виживання клітин становило від 0,38 до 63,4 %. Рівень виживання клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності ПАР після обробки Cu^{2+} корелював з концентрацією катіонів міді: у міру збільшення вмісту Cu^{2+} 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 Cu^{2+} за присутності ПАР виявилися клітини із стаціонарної фази росту, що можна пояснити вищою концентрацією синтезованих поверхнево-активних речовин.

При вивченні дії Cu^{2+} на клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з стаціонарної фази росту було встановлено, що незалежно від концентрації Cu^{2+} і наявності ПАР усі клітини гинули, тому у наступних експериментах досліджували клітини тільки з експоненційної фази росту (табл. 2). Показано, що за присутності

0,1 мМ катіонів міді виживання клітин штаму ІМВ В-7241 як за наявності ПАР так і без них було практично однаковим (50—55 %). За вищої концентрації Cu^{2+} (0,5 мМ) усі клітини, позбавлені ПАР, гинули, в той час як у суспензії, що містила ПАР виживало 32 % клітин. Концентрація катіонів міді 1 мМ виявилася занадто високою для штаму ІМВ В-7241, оскільки призводила до загибелі усіх клітин, незалежно від наявності ПАР.

На другому етапі досліджень вивчали захисну функцію ПАР штаму ІМВ Ас-5017 щодо нативної нафтоокиснювальної мікрофлори води (табл. 3).

Таблиця 3. Вплив ПАР на виживання клітин нативної мікрофлори води за наявності Cu^{2+}

Морфотип	Концентрація Cu^{2+} , мМ	Наявність у суспензії ПАР	Виживання клітин, %
1	0,01	-	59±2,95
		+	91±4,5
	0,05	-	45±2,25
		+	45±2,25
2	0,01	-	0,4±0,02
		+	95±5
	0,05	-	0,1±0,005
		+	76±3,8

Раніше [2] нами було проведено дослідження, спрямоване на встановлення ефективності препарату ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в очищенні води від нафти за присутності Cu^{2+} . Було показано, що у забрудненій воді за наявності катіонів міді і ПАР нативна мікрофлора активніше розвивалася, ніж у воді, що була необроблена препаратом ПАР і не містила Cu^{2+} . Ми припустили, що ПАР захищають від дії катіонів міді не тільки клітини продуцента, а й нативну мікрофлору води. Під час проведення мікробіологічного контролю досліджуваних водойм було виділено 2 культури, чисельність яких у порівнянні з іншими суттєво збільшувалась впродовж процесу біоремедіації. Досліджуючи морфотипи виділених культур методом мікроскопіювання з імерсією (90Ч) було встановлено, що: морфотип 1 — грамнегативні паличкоподібні клітини правильної форми, довжиною 2—4 мкм, при рості на МПА утворювали округлі, матові, випуклі з рівними краями колонії кремового кольору; морфотип 2 — грампозитивні кокові форми, діаметром 1—1,5 мкм, розміщені у вигляді пакетів по 4—8 клітин, очевидно сардини, при рості на МПА утворювали випуклі, блискучі колонії, жовто-коричневого кольору. Виділені культури використовували для вивчення захисної функції ПАР.

Як видно з наведених у табл. 3 даних, поверхнево-активні речовини захищали клітини природної мікрофлори води від токсичного впливу металу. Так, виживання 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 супроводжувалось 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.

Висновки. Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 захищали клітини продуцентів від Cu^{2+} . За присутності ПАР і 0,01—0,5 мМ катіонів міді виживання клітин обох штамів було суттєво вищим, ніж без поверхнево-активних речовин. Слід відзначити, що стійкість клітин до дії катіонів міді

залежала від фази росту штамів. Так, виживання *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 за наявності Cu^{2+} було вищим у стаціонарній, а *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 у експоненційній фазі росту. ПАР штаму ИМВ Ас-5017 позитивно впливали на виживання природної нафтоокиснювальної мікрофлори води: за наявності ПАР виживало 100 % клітин, в той час як без ПАР спостерігали їх повну загибель.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды нефти / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, И.Н. Волошина, Н.Н. Грегирчак // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — №1. — С. 58—63.
2. Filyuk I.V. Water remediation by biosurfactant preparation of *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 in presence of Cu^{2+} / I.V. Filyuk, A.P. Sofilkanych, T.P. Pirog // Materiały Międzynarodowej Naukowo-Praktycznej Konferencji «Rozwój nauk humanistycznych» (27.02.2012—29.02.2012, Poznań). — Р. 41—44.
3. Софилканич А.П. Влияние Cu^{2+} на синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 на различных субстратах / А.П. Софилканич, И.В. Филук, С.А. Антонюк, Т.П. Пирог // Биология XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16—21 апреля 2012 года). Сборник тезисов. — С. 198.
4. Chrzanowski L. Why do microorganisms produce rhamnolipids? / L. Chrzanowski, L. Lawniczak, K. Czaczek // World J Microbiol Biotechnol. — 2012. — V. 28, № 2. — Р. 401—419.
5. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Ігнєвська, Т.П. Пирог. К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
6. Hoffmann T., Bremer E. Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible solute acquisition // J Bacteriol. — 2011. — V. 193, № 7. — Р. 1552—1562.
7. de Carvalho C.C. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions / C.C. de Carvalho // Res Microbiol. — 2012. — V. 163, № 2. — Р. 125—136.
8. Rapp P. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase / P. Rapp, L.H. Gabriel-Jurgens // Microbiology. — 2003. — V. 149, № 8. — Р. 2879—2890.
9. Burkewitz K. Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in *C. elegans* / K. Burkewitz, K. Choe, K. Strange // Am J Physiol Cell Physiol. — 2011. — V. 301, № 3. — Р. 566—576.
10. Gadd G.M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation / G.M. Gadd // Microbiol. — 2010. — V. 156, № 3. — Р. 609—643.
11. Gnanamani A. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals / A. Gnanamani, V. Kavitha, N. Radhakrishnan, G.S. Rajakumar, G. Sekaran, A.B. Mandal // Biointerface. — 2010. — V. 79, № 4 — Р. 334—339.

И.В. Филук, А.П. Софилканич,

А.Д. Конон, С.А. Парфенюк, Т.П. Пирог

Защитные свойства поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ АС-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241

Установлено, что поверхностно-активные вещества (ПАВ), синтезируемые *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 способны защищать как клетки продуцента, так и природной нефтеокисляющей микрофлоры от токсического действия катионов меди (0,01 — 0,5 мМ). Так,

в присутствии 0,01 мМ Cu^{2+} наблюдали полную гибель клеток *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 без поверхностно-активных веществ, тогда как при наличии ПАВ выжило до 65 % клеток. При действии 0,5 мМ катионов меди на клетки *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 выживало 32 % клеток в присутствии ПАВ, в то время как без ПАВ все клетки погибали. Выживание клеток нативной нефтеокисляющей микрофлоры воды при наличии катионов меди и ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 составляло 100 %, в то время как без ПАВ наблюдали их полную гибель. Установлено зависимость выживания клеток штамма ИМВ Ас-5017 при действии катионов меди от их физиологического состояния.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, защитные функции, катионы меди, выживание клеток.

I. Filyuk, A. Sofilkanych,
A. Konon, S. Parfenyuk, T. Pirog

Protective properties of surface-active substances of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241

It is known that surface-active substances (SAS, surfactants) are able to form stable complexes with heavy metals (Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cd^{2+}) and so to protect the cells of producer from their toxic effect.

It was determined that surfactants synthesized by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 are able to protect cells of producers and native oil oxidizing microflora from toxic influence of copper cations (0.01—0.5 мМ). Thus, the total death of *R. erythropolis* IMV Ac-5017 cells without SAS was observed in presence of 0.01 мМ of Cu^{2+} , while in the presence of surfactants 65 % of cells survived. The survival of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 cells was 32 % in presence of surfactants and 0.5 мМ copper cations while without SAS all cells died. The 100 % survival of cells of native water microflora was determined in the case of Cu^{2+} presence and treatment with surfactants of *R. erythropolis* IMV Ac-5017. In suspension with copper cations without surfactants the total cell death was observed. It was shown that survival of IMV B-7241 cells in presence of copper cations depended on the physiological state of cells.

Key words: surface-active substances, protective properties, copper cations, cells' survival.

e-mail: jimp@ukr.net

Одержана редколегією 14.03.2012 р.