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

**Kateryna Panasiuk**

*National University of food technologies, Kyiv, Ukraine*

***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

**ABSTRACT**

**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 $CuSO_4 \times 5H_2O$, $CdSO_4 \times 8H_2O$ and $(CH_3COO)2Pb \times 3H_2O$ 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 невигідними 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 біоплівок. 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 грунту був виділений штам нафтоокислювальних бактерій *Nocardia vaccinii* К-8 [9], депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером ІМВ В-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* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-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* ІМВ В-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; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ – 0,1;. $NaNO_3$– 0,5. У середовище культивування додатково вносили $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 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 вищенаведеного 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 °С 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 eppendorf 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 $CuSO_4 \times 5H_2O$, $CdSO_4 \times 8H_2O$ і $(CH_3COO)_2Pb \times 3H_2O$, 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* ІМВ В-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 ІМВ В-7405, ніж без поверхнево-активних речовин. За додавання 0,1−0,3 мМ $Cd^{2+}$ і $Pb^{2+}$ в суспензію клітин *N. vaccinii* ІМВ В-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* ІМВ В-7405, позбавлених ПАР, тоді як за присутності поверхнево-активних речовин виживало до 19 % клітин.

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

Виживання клітин *N. vaccinii* ІМВ В-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, виживання 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 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.

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* ІМВ В-7405, що містить ПАР, для деструкції нафти у воді та ґрунті [16], ми припустили можливість застосування ПАР штаму ІМВ В-7405 для розкладання комплексних з важкими металами нафтових забруднень. Вивченню цього питання, а також дослідженню захисних властивостей ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 щодо клітин нативної мікрофлори води, будуть присвячені наші подальші дослідження.

В результаті проведених досліджень встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *N. vaccinii* ІМВ В-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 ІМВ В-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* ІМВ В-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* ІМВ В-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, *Microbiololgy*. 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. *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* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-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* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Харчова промисловість*., Т.2 № 10–11, С.121–126.
13. 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 trough growing cells, *Environ. Int.,* 30(9), pp. 261–278.
2. Gadd G.M. (2010), Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation, *Microbiololgy*, 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 nefti, Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya, 41(1), pp. 58–63.
10. Pirog T.P. (2011), Optimizatsiya sinteza poverkhnostno-aktivnykh veshchestv Nocardia vaccinii K-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 rechovyn 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 rehuliatsii skladu i fizyko-khimichnykh vlastyvostei ekzopolisakharydiv, syntezovanykh Acinetobacter sp, Phd thetis, Kyiv.
15. Sofilkanych A. P. (2012), Rozrobka tekhnolohii poverkhnevo-aktyvnykh rechovyn Rhodococcus erythropolis EK-1 z vykorystanniam promyslovykh vidkhodiv, Phd thetis Kyiv.
16. Hrytsenko N. A. (2012), Rozrobka tekhnolohii poverkhnevo-aktyvnykh rechovyn Nocardia vaccinii K-8, Phd thetis, Kyiv.