

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЛИПАЗ МИКРОМИЦЕТОМ *RHIZOPUS ARRHIZUS* CNMN- FD- 03 ПОД ВЛИЯНИЕМ НАНОЧАСТИЦ ОКИСЛОВ НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОВ

Чилочи Александра¹, Тюрина Жаннета¹, Лаблюк Светлана¹, Дворнина Елена¹, Клапко Стелиана¹, Бивол Чезара¹, Гуцул Татиана², Руссу Емил².

¹Институт микробиологии и биотехнологии Академии Наук Молдовы

²Институт электронной инженерии и нанотехнологий им. "Д.Гуцу"

Rezumat

În articol sunt prezentate rezultatele studiului influenței nanoparticulelor unor oxizi metalici (MgO, ZnO, nanocompoziția ZnO/MgO, TiO₂, Fe₃O₄) asupra biosintezei lipazelor exocelulare la tulpina de micromicete *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 la cultivarea în profunzime. A fost stabilită modificarea nivelului activității lipolitice și perioadei de sinteză maximă a lipazelor exocelulare în funcție de compoziția, dimensiunile și concentrația nanooxidilor, cât și pH-ul inițial al mediului de cultivare. Efectul biostimulator maximal a fost determinat de nanooxidul Fe₃O₄, cu dimensiunea de 70 nm în concentrații de 5 și 10 mg/L. La cultivarea producătorului pe mediul nutritiv cu valoarea inițială a pH-ului 8,0 activitatea lipolitică depășește de 3 ori nivelul martorului, constituind 95576-101068 u/ ml față de 30000 u/ml în varianta martor.

Cuvinte-cheie: micromicete, nanoparticule, lipaze

Depus la redacție 08 iunie 2017

Adresa pentru corespondență: Ciloci Alexandra, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 1, MD2028 Chișinău, R. Moldova; E-mail: alexandra.ciloci@gmail.com; tel. (+373 22) 739824

Введение

Для повышения биосинтетических способностей штаммов микромицетов - продуцентов гидролаз используются классические подходы в сочетании с новыми технологическими и физико-химическими решениями как, например, применение электромагнитных волн низких частот, координационных соединений переходных металлов [1-4]. В настоящее время возрастающее внимание уделяется перспективам использования материалов в диапазоне размеров до 100 нм, которые по своим физическим, химическим и биологическим свойствам отличаются от тех же веществ микронного и более крупного размера. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность находят широкое применение в микроэлектронике, энергетике, строительстве, химико-фармацевтической, косметической, пищевой промышленности, в биологии и медицине [5, 6]. Неоднократно доказана эффективность применения наночастиц биогенных металлов в качестве стимуляторов роста, развития и продуктивности растений [7-10]

Ряд авторов в своих работах отмечают выраженные свойства наночастиц стимулировать рост и биосинтез вторичных метаболитов у микроорганизмов-продуцентов, что открывает перспективу их использования для управляемого культивирования микроорганизмов [11-15]. В особенности это относится к металлам и их нано соединениям. Отличительной особенностью наночастиц металлов является их меньший токсический эффект по сравнению с солями

металлов и способность активизировать физиологические и биохимические процессы в живой клетке. Высокая активность наночастиц специфически обусловлена их малыми размерами и высокоразвитой межфазной поверхностью, высокими адсорбционными свойствами, наличием ненасыщенных валентностей металла и образованием большого набора хелатных соединений [11, 16, 19-22].

Целью данной работы было изучить влияние нано-окислов некоторых металлов на биосинтетические способности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 – активного продуцента внеклеточных липолитических ферментов.

Материал и методы

Объектом исследований служил штамм микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03, отобранный как перспективный продуцент внеклеточных ферментов липолитического действия [23]. Штамм хранится в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Республики Молдова при Институте микробиологии и биотехнологии АНМ.

Культивирование штамма осуществлялось при температуре 28-30°C в конических колбах Эрленмейера объемом на 500 мл со 100 мл питательной среды, на качалках (180-220 об/мин.), на среде ранее подобранного состава, (г/л): соевая мука – 35,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,0; K_2HPO_4 – 5,0; pH – 8,0 и 4,0. В качестве посевного материала использовалась водная суспензия спор 30-и дневной культуры, выращенной на скошенной сусло-агаровой среде, в количестве 10% от инокулированного объема в концентрации 10^6 спор/мл. Культивирование продуцента производилось в течение 1-4 суток.

Было изучено влияние окислов металлов: MgO (10,2 нм); ZnO/MgO в соотношении 1:4 (11,7/10,2 нм); ZnO (11,7 нм); TiO_2 (30 нм); Fe_3O_4 (10 нм, 30 нм, 70 нм и 80-90 нм). Наночастицы вносились в питательные среды в различных концентрациях (2,5; 5,0; 10,0; 15,0 мг/л) одновременно с посевным материалом. В качестве контроля использовалась среда, не содержащая наночастицы.

Липолитическую активность определяли по расщеплению оливкового масла до олеиновой кислоты, используя модифицированный метод Ота-Ямада, с использованием в качестве субстрата 40% эмульсию оливкового масла в поливиниловом спирте [24, 25].

Результаты и их обсуждение

На первых этапах исследования было проведено тестирование вышеназванной группы наночастиц по степени их влияния на энзиматическую активность липаз, синтезируемых микромицетом *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03. Наночастицы окислов металлов вносились в питательную среду в концентрации 2,5 мг/л. Полученные результаты представлены в таблице 1 и показывают, что активность липолитических ферментов в экспериментальных вариантах с использованием наночастиц MgO, смеси ZnO/MgO (1:4) и ZnO сохраняется на уровне активности в контрольном варианте: 23437 ед/мл, 24062 ед/мл и 24375 ед/мл, соответственно, по сравнению с 25625 ед/мл в контроле.

Интересные результаты получены при использовании наночастиц TiO_2 и Fe_3O_4 . В этих вариантах наблюдается увеличение активности внеклеточных липаз на 34,15% и 47,55%, соответственно, по сравнению с контролем.

Таблица 1. Изменение липолитической активности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц окислов металлов (концентрация 2,5 мг/л; 2 суток культивирования).

Наночастицы	Размеры (нм)	Липолитическая активность	
		ед/мл	%
MgO	10,2	23437±0,02	91,46
ZnO/MgO (1:4)	10,2/11,7	24062±0,03	93,90
ZnO	30	24375±0,03	95,12
TiO ₂	30	34375±0,01	134,15
Fe ₃ O ₄	30	37812±0,02	147,55
контроль	-	25625±0,01	100,0

Одним из ключевых параметров наночастиц, определяющим их физико-химические и биологические свойства, являются их размеры. Для определения биологических свойств в зависимости от размеров, было изучено влияние наночастиц с разными размерами (10 нм, 30 нм, 70 нм и 80-90 нм) на липолитическую активность микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03, в динамике его глубинного культивирования (1, 2, 3 сутки).

Из результатов, представленных в таблице 2 и на рис. 1 видно, что в контрольном варианте липолитическая активность штамма составила 13125 ед/мл (1 сутки), 30000 ед/мл (2 сутки) и 22500 ед/мл (3 сутки). То есть, максимум накопления внеклеточных липаз в контрольном варианте наблюдается на 2 сутки культивирования продуцента.

Таблица 2. Изменение липолитической активности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц Fe₃O₄ с разными размерами.

Размеры наночастиц	Конц., мг/л	1 сутки ед/мл	2 сутки ед/мл	3 сутки ед/мл
10 нм	2,5	21875±0,01	42500±0,02	28542±0,01
	5,0	21146±0,01	42083±0,04	27500±0,04
	10,0	22604±0,03	42916±0,01	30000±0,02
30 нм	2,5	18375±0,02	42500±0,01	31667±0,03
	5,0	17937±0,01	40000±0,01	23542±0,01
	10,0	15750±0,01	37500±0,02	23750±0,02
70 нм	2,5	13296±0,03	36639±0,00	78450±0,00
	5,0	13387±0,01	37107±0,02	95576±0,01
	10,0	13565±0,01	37188±0,01	101068±0,00
80-90 нм	2,5	11943±0,04	26172±0,03	24729±0,00
	5,0	11650±0,02	26952±0,04	25844±0,00
	10,0	12298±0,03	28125±0,04	26442±0,01
контроль	-	13125±0,02	30000±0,01	22500±0,02

Результаты полученные в экспериментальных вариантах показывают, что тестируемые наночастицы, в зависимости от размеров и концентраций, оказывают различное воздействие на биосинтез липолитических ферментов

изучаемого штамма. Использование наночастиц Fe_3O_4 с малой размерностью (10 нм), уже в первые сутки культивирования штамма приводит к возникновению стимулирующего эффекта, который, в зависимости от концентрации, составляет 61,11-72,22%, по сравнению с контролем того же дня (13125 ед/мл). На вторые сутки стимулирующий эффект несколько ниже и составляет 40,27-43,05%, по сравнению с контролем того же дня (30000 ед/мл), представляющим максимум для контроля. На третьи сутки наблюдается снижение стимулирующего эффекта до 22,22-33,34% по отношению к контролю (22500 ед/мл). Варьирование активности липаз в зависимости от концентрации представляется не столь значительным, однако все же можно отметить, что при использовании наночастиц с малой размерностью (10 нм) наибольший стимулирующий эффект получен при концентрации наночастиц 10 мг/л.

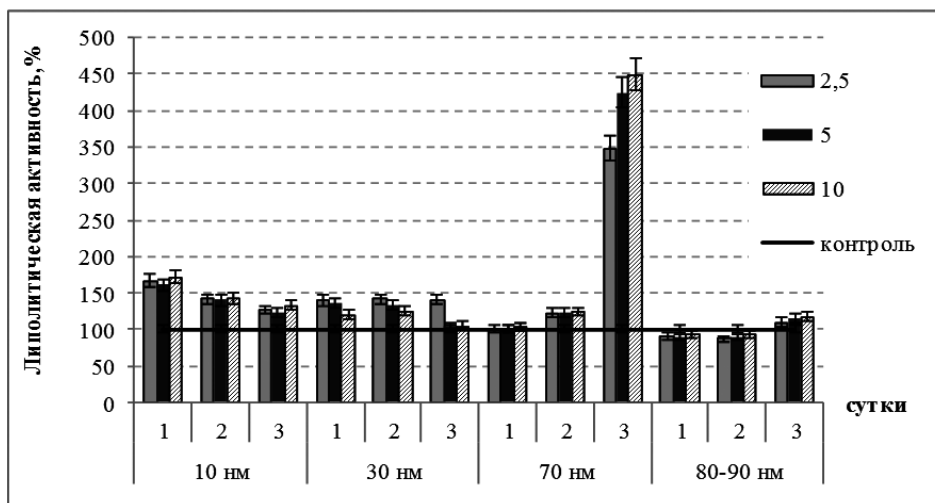


Рисунок 1. Изменение липолитической активности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц Fe_3O_4 с разными размерами и концентрациями. (2,5; 5,0; 10 мг/л).

Воздействие наночастиц с более крупными размерами (30 нм) на биосинтез липаз осуществляется несколько по-другому. В первые сутки, как и при использовании наночастиц с размерами в 10 нм, возникает стимулирующий эффект, но он значительно ниже и с повышением концентрации от 2,5 мг/л до 10 мг/л снижается от 40,0% до 20,0%, по отношению к контролю (13125 ед/мл). На вторые сутки культивирования эта зависимость сохраняется. Стимулирующий эффект снижается от 41,66% до 25,0% по отношению к контролю (30000 ед/мл). Оптимальной для наночастиц Fe_3O_4 с размерами 30 нм является концентрация 2,5 мг/л.

Воздействие наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм осуществляется в замедленном режиме, очевидно, в связи с большей затрудненностью их прохождения через цитоплазматическую мембрану. В первые сутки культивирования штамма эффект от использования наночастиц практически нейтральный 1,10-3,35% (контроль 13125 мг/л). На вторые сутки наблюдается нарастание стимулирующего эффекта, колебания которого в зависимости от

использованной концентрации незначительные и составляют 22,13-23,96% по отношению к максимальному контролю (30000 ед/мл). Наилучшие результаты получены на третьи сутки культивирования продуцента. Активность липаз в зависимости от использованной концентрации составляет 78450-101068 ед/мл, то есть увеличивается на 248,67-349,19% по отношению к контролю третьих суток (22500 ед/мл) и на 161,18-236,89% по сравнению с максимальным контролем (30000 ед/мл).

В вариантах эксперимента с наночастицами Fe_3O_4 с самыми крупными размерами (80-90 нм) в первые и вторые сутки культивирования продуцента отмечено незначительное снижение активности липаз по сравнению с соответствующими контролями. Активности липаз в оптимизированных вариантах составляет 87,24-93,75% по сравнению с контролями того же дня и только на 3 сутки культивирования штамма наблюдается незначительное увеличение ферментной активности на 9,91% (конц. 2,5 мг/л), 14,86% (конц. 5 мг/л) и 17,52% (конц. 10 мг/л) по сравнению с контролем того же дня (22500 ед/мл). Повышение концентрации наночастиц Fe_3O_4 до 15 мг/л приводит к снижению липолитической активности во всех вариантах, независимо от размеров. Например, при применении наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм, в концентрации 15 мг/л, активность липаз снижается от 101068 ед/мл (конц. 10 мг/л) до 55665 ед/мл и составляет 185,55% от максимального контроля (30000 ед/мл).

Таким образом, установлено, что наибольший стимулирующий эффект получен при использовании наночастиц с размерами 70 нм, в концентрации 5,0 и 10,0 мг/л, что обеспечивает увеличение активности внеклеточных липаз штамма более, чем в 3 раза по сравнению с контролем. В настоящее время в литературе недостаточно сведений о взаимосвязи биосинтеза внеклеточных ферментных белков микроорганизмов и состоянии внутриклеточного обмена продуцентов. Однако, известно, что ионы железа оказывают положительное воздействие на функционирование электронно-транспортной системы, обеспечивая увеличение пула АТФ. Учитывая этот факт, можно предположить, что стимуляция биосинтеза внеклеточных липаз при применении наночастиц Fe_3O_4 с размерами 10-70 нм может быть обусловлена повышением энергообеспеченности этого процесса, который является весьма энергоемким – на создание одной пептидной связи затрачивается 16,9 калорий [26-28].

Более значительный стимулирующий эффект, установленный при использовании наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм, может быть обеспечен тем, что в отличие от размеров 80-90 нм, наночастицы с размерами 10-70 нм, благодаря меньшим размерам, могут свободно пройти через цитоплазматическую мембрану микромицета и принять прямое участие в происходящих в клетке процессах, как биосинтез ферментных белков и их переход из неактивного предшественника в активное состояние путем придания глобулярной конфигурации с помощью образования дисульфидных мостиков.

Внеклеточные липазы, синтезируемые микромицетом *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03, относятся к серин-гистициновым ферментам, для проявления каталитической активности которых необходимо образование 6 дисульфидных мостиков [24, 29-30]. Следовательно, наночастицы Fe_3O_4 в клетке могут играть

роль не микроэлементов, а поставщиков энергии. Этим можно объяснить увеличение числа каталитически активных молекул внеклеточных липаз более чем в 3 раза, по сравнению с максимальным контролем, при использовании наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм, а также, проявление максимума накопления внеклеточных липаз изучаемого штамма на сутки позже (3 суток в отличие от 2 суток в контроле).

Следующим этапом исследований было проведение экспериментов по глубинному культивированию микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 при использовании наночастиц Fe_3O_4 с оптимальными размерами (70 нм) и оптимальными концентрациями (5,0 и 10,0 мг/л) в расширенном диапазоне некоторых технологических параметров: 4 суток культивирования (1, 2, 3, 4 сутки) и различные значения исходной кислотности среды – щелочной (рН 8,0) и кислой (рН 4,0). Целью эксперимента было выявить влияние исходного значения рН среды на биологические свойства наночастиц и подобрать оптимальные условия глубинного культивирования продуцента в присутствии наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм. Результаты, представленные в таблице 3 и на рис. 2, показывают, что в контрольных вариантах, полученных при исходном щелочном значении рН питательной среды (рН 8,0) уровень липолитической активности колеблется в пределах, полученных в предыдущих опытах: 13083 ед/мл (1 сутки); 28750 ед/мл (2 сутки); 21625 ед/мл (3 сутки) и 12125 ед/мл (4 сутки). Максимум активности наблюдается на 2 сутки культивирования штамма. Величины липолитической активности продуцента в контрольных вариантах, полученных при кислом (рН 4,0) значении рН исходной кислотности среды, были значительно ниже, чем при щелочном (рН 8,0) значении: 4812 ед/мл (1 сутки); 14916 ед/мл (2 сутки); 12250 ед/мл (3 сутки) и 9875 ед/мл (4 сутки).

Таблица 3. Изменение липолитической активности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц Fe_3O_4 с оптимальными размерами (70 нм) в динамике культивирования на средах с различной исходной кислотностью.

Исходный рН среды	конц., мг/л	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки
		ед/мл	ед/мл	ед/мл	ед/мл
рН 8,0	5,0	13445±0,01	35916±0,03	90667±0,01	15250±0,01
	10,0	13591±0,01	35833±0,01	95208±0,00	15791±0,01
	контроль	13083±0,01	28750±0,02	21625±0,02	12125±0,01
рН 4,0	5,0	4803±0,06	14167±0,01	12416±0,01	8958±0,03
	10,0	4696±0,03	14083±0,01	11875±0,02	9583±0,02
	контроль	4812±0,09	14916±0,03	12250±0,02	9875±0,02

Результаты показывают, что изменение исходного значения рН среды в кислую сторону (рН 4,0) приводит к уменьшению липолитической активности штамма по сравнению со значениями при рН 8,0, в контрольных вариантах в 2,73 раза (1 сутки); 1,92 раза (2 сутки); 1,76 раз (3 сутки) и 1,23 раза (4 сутки). Причем видно, что к 4-ым суткам культивирования штамма разрыв в величинах активности, получаемых при разных значениях исходной рН среды, постепенно уменьшается. В оптимизированных вариантах, полученных при исходном щелочном значении (рН 8,0) питательной среды, получены результаты, подтверждающие результаты

предыдущих экспериментов и свидетельствующие о возможности получения значительного стимулирующего эффекта при использовании наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм, взятых в концентрациях 5,0 и 10,0 мг/л.

В данном эксперименте, на 3 сутки культивирования продуцента в этих условиях, получено увеличение липолитической активности штамма более, чем в 3 раза по сравнению с максимальным контролем (2 сутки): 90667 ед/мл (конц. 5 мг/л) и 95208 ед/мл (конц. 10 мг/л) по сравнению с 28750 ед/мл в контроле.

При исходном кислотном значении рН (рН 4,0) среды в экспериментальных вариантах происходит резкое снижение липолитической активности микромицета практически до уровня контрольных вариантов, полученных при этом же кислотном значении рН среды. Отмеченные колебания активности липаз находятся в интервале: 92,33% - 101,67% от соответствующих контролей. При этом почти полностью исчезает стимулирующий эффект наночастиц, отмеченный при щелочном рН 8,0.

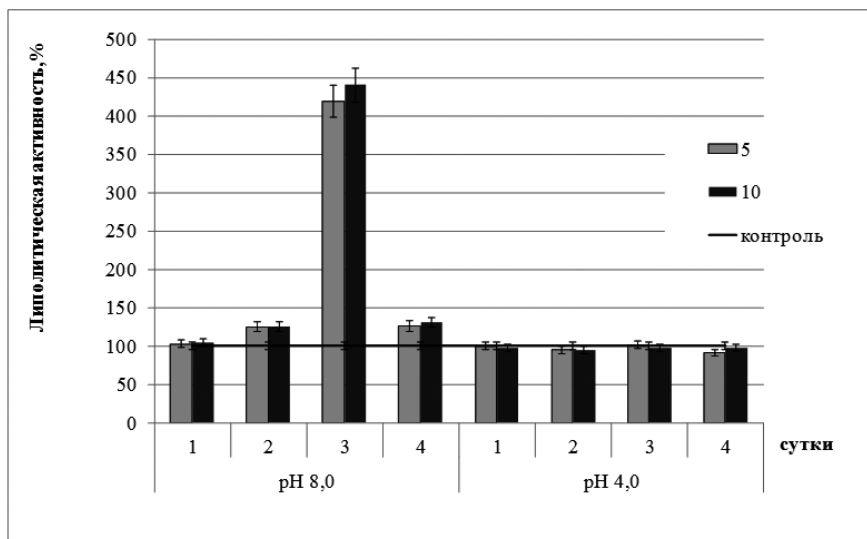


Рисунок 2. Изменение липолитической активности микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 под влиянием наночастиц Fe_3O_4 с оптимальными размерами (70 нм) в концентрациях 5 и 10 мг/л.

Полученные результаты позволяют предположить, что изменение исходной кислотности питательных сред от щелочного рН 8,0, оптимального для биосинтеза липаз для изучаемого штамма, в кислую сторону (рН 4,0) приводит как к изменению уровня ферментообразования штамма *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03, так и к изменению биологических свойств наночастиц Fe_3O_4 , что может быть связано с изменением их второго, не менее важного параметра, как дзета-потенциал, который возникает при перемещении наночастиц между слоем ионов на поверхности частиц и слоем ионов среды, окружающей частицы.

ζ-Потенциал обуславливает способность частицы сорбироваться на поверхности и зависит от рН окружающей среды. Различный ζ-потенциал также может быть причиной наличия или отсутствия токсичности наночастиц [16, 31].

Выводы

Использование наночастиц Fe_3O_4 , отобранных по результатам проведенного скрининга, при глубинном культивировании микромицета *Rhizopus arrhizus* CNMN-FD-03 – перспективного продуцента внеклеточных липаз, провоцирует возникновение стимулирующего эффекта, уровень которого варьирует в значительных пределах в зависимости от размеров наночастиц (10 нм, 30 нм, 70 нм, 80-90 нм) и использованной концентрации (2,5; 5,0; 10,0; 15,0 мг/л), а также к изменению периода проявления максимума накопления липолитических ферментов.

Наибольший стимулирующий эффект получен при использовании наночастиц Fe_3O_4 с размерами 70 нм, взятых в концентрациях 5,0 и 10,0 мг/л, что обеспечивает увеличение липолитической активности продуцента в более чем в 3 раза по сравнению с контролем.

Изменение исходного значения кислотности питательной среды от оптимального (рН 8,0) для изучаемого штамма в кислую сторону (рН 4,0) приводит как к изменению уровня ферментообразования у продуцента, так и биологических свойств наночастиц Fe_3O_4 .

Литература

1. Chiloci A.A., Tiurina Zn. P., Klapco S. F., Stratan M.V., Labliuc S. V., Dvornina E. G., and Kondruk V. F. Effect of Millimetre-Range Electromagnetic Radiation of the Biosynthesis of Extracellular Hydrolytic Enzymes in *Aspergillus* and *Penicillium* Micromycetes. //Surface Engineering and Applied Electrochemistry, 2011, Vol.47, No. 6, pp. 558-564. DOI: 10.3103/S106837551106007X

2. Десятник А.А., Гэрбэлэу Н.В., Корочану Э.Б. и др. Использование диметилглиоксиматов Со (III) при биосинтезе пектиназ *Rhizopus arrhizus*. //Координационная химия, 2002, том 28, №2., с.144-148.

3. Боурош П.Н., Корочану Э. Б., Чилочи А. А., Клапко С. Ф., Болога О. А., Бивол Ч. М., Тюрина Ж. П., Булхак И. И. Новые диоксиматы Со(III) с гексафторофосфат-ионом – стимуляторы протеолитической активности микромицета *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12. //Координационная химия, 2013, том 39, № 11, с. 669–678 ISSN 1070-3284 (IF: 0.466).

4. Deseatinic A., Tiurina J., Garbălău N., Coropceanu E., Labliuc S., Bologa O. Mediu nutritiv pentru cultivarea tulpini de fungi *Rhizopus arrhizus*. Brevet de invenție №1748 BOPI, №9, 2001.

5. Rusu E., V. Ursaki, T. Gutul, P. Vlazan, and A. Simine. Characterization of TiO_2 Nanoparticles and ZnO/TiO_2 Composite Obtained by Hydrothermal Method, 3rd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. Springer Science+Business Media Singapore 2016, IFMBE Proceedings 55, p. 93. DOI: 10.1007/978-981-287-736-9_22.

6. Rai, M. N., Duran (eds.), Metal Nanoparticles in Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, 305 p. DOI 10.1007/978-3-642-18312-6_1

7. Виноградов Д.В. Использование ультрадисперсных металлов в сельскохозяйственном производстве / Д.В. Виноградов, Л.В. Потапова //Международный технико-экономический журнал, 2009.- №3.- С.40-43

8. Назарова А.А., Жеглова Т.В., Полищук С.Д., Чурилов Г.И. Действие ультрадисперсных порошков металлов на накопление биологически активных соединений в лекарственных растениях. //Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр./ под ред. М.В. Гаврилина. Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2009. Вып. 64, с 87-88.

9. Федоренко В.Ф. Нанотехнологии и наноматериалы в агропромышленном комплексе. Науч. изд. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2008. 148 с.
10. Фолманис Г.Э., Коваленко Л.В. Ультрадисперсные металлы в сельскохозяйственном производстве. М.: ИМЕТ РАН, 1999. 80 с.
11. Завигальский Г.Б., Котова В.Ю., Хрульнова С.А. и др. Оценка токсического действия наноматериалов на живые организмы. //Биотехнология, 2015, №6, с. 8-17.
12. Driouch H., Roth A., Dersch P., Wittmann C. Filamentous fungi in good shape: microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. //Bioeng. Bugs. 2011, Mar-Apr; 2(2): 100-4. Doi: 10/4161/bbug.2.2.13757.
13. Walisko R., Krull R., Schrader J., Wittmann C. Microparticle based morphology engineering of filamentous microorganisms for industrial bio-production. //Biotechnol. Lett. 2012; 34:1975-1982. Doi: 10.1007/s10529-012-0997-1.
14. Van Deependra Kumar, Subhankar. Zinc Oxide Nanoparticles Modulates the Production of β -Glucosidase and Protects its Functional State under Alcoholic Condition in *Saccharomyces cerevisiae*. //Appl. Biochem. Biotechnol., 2014, 173:155–166 DOI 10.1007/s12010-014-0825-2.
15. Kiran G. S., Lipton A. N., Sethu P., Kumar A. and Joseph Selvin. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solidstate culture by marine *Nocardiosis* sp. MSA13A. //BMC Biotechnology 2014, 14:48.
16. Грецкий И. А., Жолобак Н. М., Щербакоев А. Б., Иванов В. К., Громозова Е. Н., *Photobacterium phosphoreum* – объект для изучения биологических эффектов наночастиц диоксида церия //«Живые и биокосные системы». 2016, № 15; URL.: <http://www.jbks.ru/archive/issue-15/article-11>
17. Луцаева И.В., Моргалев С.Н.. Изучение воздействия наночастиц TiO_2 и Al_2O_3 на бактерии *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus tucliaginosus*. //Вестник Томского государственного университета. Биология, 2009 № 4 (8), с.97-105.
18. Чилочи, А.; Тюрина, Ж.; Лаблюк, С.; Дворнина, Е.; Клапко, С.; Бивол, Ч.; Гуцул, Т.; Русу, Е.; Никоричи, А. Влияние нано окислов некоторых металлов на биосинтез внеклеточных гидролаз микромицетов. //Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Seria Științele vieții. 2016, 3(330) p.164-171.
19. Павлов, Г.В, Фолманис Г.Э. Биологическая активность ультрадисперсных порошков: Монография. М.: Исследовательский центр проблем качества подготовки специалистов, 1999. 78 с.
20. Дерябина Т.Д. Оценка безопасности ионов, нано- и микрочастиц железа и меди в тесте прорастания семян *Triticum aestivum*. //Вестник ОГУ №12 (131), декабрь, 2011, с. 386-389.
21. Куцкир М.В. Определение экологической безопасности наноматериалов на основе морфофизиологических и биохимических показателей сельскохозяйственных культур. Диссертация на соискание у. с. к.б.н. Рязань, 2014. 133 с.
22. Андрусишина И.Н.. Наночастицы металлов: способы получения, физико-химические свойства, методы исследования и оценка токсичности. //Сучасні Проблеми Токсикології 3/2011.
23. Deseatinic A., Sîrbu T., Tiurina J., Labliuc S. Tulpina de fungi *Rhizopus arrhizus* Fisher-67 – producătoare de enzime lipolitice. Brevet de invenție №2458 BOPI, № 1, 2004.
24. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы. М. Наука, 1977, 216 с.
25. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М. Легкая и пищ. пром., 1980, с. 75-76.
26. Ленинджер А. Биохимия. М. Мир. 1974, 957 с.
27. Роуз Э. Химическая микробиология. М. Мир. 1971, 293 с.

28. *Феоктистова Н.В., Знаменская Л.В., Лецинская И.Б.* Влияние ионов металлов на синтез внеклеточных ферментов спорообразующими бактериями. Биолог. Науки, М. «Высшая школа», №2(338), 1992, с. 18-24
29. *Брокерхоф Х., Дженсен Р.* Липолитические ферменты. М. Мир, 1978, 396 с
30. *Беккер З.Е.* Физиология и биохимия грибов. М. Изд-во Моск. ун-та, 1988, 230 с.
31. *Минулина Р.Т.* Оценка токсичности наноматериалов и использование микроорганизмов. Диссерт. на соискание канд. биол. наук. Казань, 2014, с.