

ISSN 1029-8940 (Print)
 ISSN 2524-230X (Online)
 УДК 579.663
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-307-315>

Поступила в редакцию 03.01.2018
 Received 03.01.2018

Т. П. Пирог¹, Т. А. Шевчук², Л. В. Никитюк¹, Д. А. Луцай¹, О. И. Палийчук¹

¹Національний університет пищевых технологий, Киев, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АНТИМИКРОБНУЮ И АНТИАДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БАКТЕРИЙ РОДОВ *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* И *NOCARDIA*

Аннотация. Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются продуктами мультифункционального назначения, поскольку они способны не только снижать поверхностное натяжение на границе раздела фаз и эмульгировать различные субстраты, но и проявлять антимикробную и антиадгезивную активность (в том числе и способность к разрушению биопленок). Однако в различных условиях культивирования продуцентов состав ПАВ и их свойства могут изменяться. Одним из подходов к повышению антимикробной и антиадгезивной активности ПАВ может быть увеличение в среде культивирования продуцентов содержания активаторов ключевых ферментов биосинтеза аминлипидов – наиболее эффективных антимикробных агентов. Активаторами НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы у *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 являются катионы кальция, магния и цинка, у *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – катионы кальция.

Цель работы – исследовать антимикробную и антиадгезивную активность ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *R. erythropolis* IMV Ac-5017 и *N. vaccinii* IMV B-7405 в среде с повышенным содержанием активаторов НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы.

ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Антимикробную активность ПАВ определяли по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК), антиадгезивную – спектрофотометрическим методом. О степени разрушения биопленки судили по разнице между количеством адгезированных клеток в необработанных и обработанных ПАВ лунках полистиролового планшета с предварительно сформированной биопленкой и выражали в процентах.

Установлено, что дополнительное внесение CaCl₂ (0,1 г/л) в среду культивирования *R. erythropolis* IMV Ac-5017, повышение концентрации этой соли до 0,4 г/л в среде для выращивания *N. vaccinii* IMV B-7405, а также добавление CaCl₂ (0,1 г/л), увеличение содержания MgSO₄·7H₂O до 0,2 г/л или внесение Zn²⁺ (38 мкМ) в среду культивирования *A. calcoaceticus* IMV B-7241 сопровождалось синтезом ПАВ, МИК которых по отношению к тест-культурам были в 1,2–13 раз ниже, их адгезия на абиотических поверхностях, обработанных такими ПАВ, – в среднем на 10–40 % ниже, а степень разрушения биопленок – на 7–20 % выше по сравнению с показателями, установленными для ПАВ, полученных на базовой среде.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности регуляции антимикробной и антиадгезивной активности микробных ПАВ в процессе культивирования продуцента.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, поверхностно-активные вещества, биологические свойства

Для цитирования: Влияние условий культивирования на антимикробную и антиадгезивную активность поверхностно-активных веществ бактерий родов *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и *Nocardia* / Т. П. Пирог [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2018. – Т. 63, № 3. – С. 307–315. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-307-315>

T. P. Pirog¹, T. A. Shevchuk², L. V. Nikituk¹, D. A. Lutsai¹, O. I. Paliichuk¹

¹National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON ANTIMICROBIAL AND ANTI-ADHESIVE ACTIVITY OF SURFACTANTS OF BACTERIA OF *ACINETOBACTER*, *RHODOCOCCUS* AND *NOCARDIA* GENERA

Abstract. Microbial surfactants are multifunctional products because they cannot only reduce the surface tension at the interface and emulsify various substrates, but also display antimicrobial and anti-adhesion activity (including the ability to destroy biofilms). However, under various conditions of producer's cultivation the surfactant composition and their properties can vary. One of the approaches to increasing antimicrobial and anti-adhesion activity of the surfactant can be an increase in medium of producer cultivation content of activators of key enzymes biosynthesis of aminolipids – the most effective antimicrobial agents. Activators of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 are cations of calcium, magnesium and zinc, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 – calcium.

Surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2:1). Antimicrobial activity of surfactants was determined by index of minimum inhibitory concentration (MIC), antiadhesive – by spectrophotometry. The degree of biofilm destruction was determined as difference between the number of adhered cells in untreated and treated with surfactant holes of polystyrene immunological plate containing pre-formed biofilm of test cultures and was expressed as a percentage.

It was found that addition of CaCl_2 (0.1 g/l) into medium cultivation of *R. erythropolis* IMV Ac-5017, increasing concentration of this salt to 0.4 g/l in medium for *N. vaccinii* IMV B-7405 growth, introduction of CaCl_2 (0.1 g/l) and increasing $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ content to 0.2 g/l, or adding Zn^{2+} (38 μM) into medium cultivation of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 was accompanied by synthesis of surfactants MICs of which against test cultures were 1.2–13 times lower, their adhesion on abiotic surfaces treated with such surfactants was on average 10–40 % lower, and the degree of biofilms destruction was 7–20 % higher than indicators established for surfactants obtained on the base medium.

The obtained data indicate the possibility of regulating antimicrobial and anti-adhesion activity of microbial surfactants under producer cultivation.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, biological properties

For citation: Pirog T. P., Shevchuk T. A., Nikituk L. V., Lutsai D. A., Paliichuk O. I. Influence of cultivation conditions on antimicrobial and anti-adhesive activity of surfactants of bacteria of *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Nocardia* genera. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 3, pp. 307–315 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-3-307-315>

Введение. Несмотря на то что на сегодняшний день промышленное производство микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) ограничивается десятком компаний [1], интерес исследователей к этим продуктам мультифункционального назначения возрастает с каждым годом [2, 3].

Если первые сообщения об антимикробной активности рамнолипидов датируются 1970-ми годами [4], то антиадгезивные свойства ПАВ микробного происхождения были установлены почти 30 лет спустя [5, 6].

По сравнению с известными антимикробными и антиадгезивными агентами микробные ПАВ имеют ряд преимуществ [1–3]: биodeградебельность и нетоксичность, благодаря чему предотвращается загрязнение окружающей среды и проявление аллергических реакций, а также возможность использования в широком диапазоне рН, температуры и других внешних факторов, что обусловлено стабильностью физико-химических свойств; при этом механизм действия, состоящий в нарушении целостности цитоплазматической мембраны, снижает возможность возникновения резистентных форм микроорганизмов.

Тем не менее одним из недостатков микробных ПАВ (впрочем, как и других вторичных метаболитов, синтезируемых в виде комплекса подобных соединений), является возможность изменения биологических свойств в различных условиях культивирования продуцента. Однако до недавнего времени эта проблема оставалась вне внимания исследователей. Только в последние годы стали появляться отдельные работы, в которых изучается взаимосвязь химического состава и свойств микробных ПАВ [3, 7–10].

В предыдущей работе [11] нами выдвинуто предположение, что поскольку поверхностно-активные аминоклипы являются наиболее эффективными антимикробными агентами, то повышенное их содержание в составе комплекса синтезированных ПАВ может сопровождаться усилением антимикробной активности целевого продукта.

Ключевым ферментом биосинтеза аминоклипов у *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 и *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 является НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа, активаторами которой у штамма IMV B-7241 являются катионы кальция, магния и цинка, у IMV Ac-5017 – кальция, у IMV B-7405 – кальция, натрия и калия [11]. Дополнительное внесение или повышение содержания активаторов фермента в среде культивирования исследуемых штаммов сопровождалось повышением НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназной активности в 1,5–3 раза по сравнению с таковой на базовой среде.

Цель данной работы – исследовать антимикробную и антиадгезивную активность ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *R. erythropolis* IMV Ac-5017 и *N. vaccinii* IMV B-7405 в среде с повышенным содержанием активаторов НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы.

Объекты и методы исследования. Объекты исследования – штаммы *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Nocardia vaccinii* К-8, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номерами ИМВ Ас-5017, ИМВ В-7241 и ИМВ В-7405 соответственно.

R. erythropolis ИМВ Ас-5017 выращивали в жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl_2 в концентрации 0,1 г/л (модифицированная среда). В качестве субстрата использовали этанол в концентрации 2 % (по объему).

Для культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; Cu^{2+} (0,16 мкМ) в виде раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 4 мг/100 мл и Fe^{2+} (3,6 мкМ) в виде 1 %-ного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 6,8–7,0 (базовая среда). В одном из вариантов в среду дополнительно вносили CaCl_2 в концентрации 0,1 г/л, а концентрацию $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ повышали до 0,2 г/л (модифицированная среда 1), в другом – дополнительно вносили Zn^{2+} (38 мкМ) в виде раствора $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 1,1 г/100 мл (модифицированная среда 2). Источник углерода – этанол в концентрации 2 % (по объему).

Штамм *N. vaccinii* ИМВ В-7405 выращивали в жидкой питательной среде (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; CaCl_2 – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) (базовая среда). В одном из вариантов содержание CaCl_2 в среде повышали до 0,4 г/л (модифицированная среда). Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 2 % (по объему).

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на соответствующих базовых средах, содержащих 0,5 % (по объему) субстрата. Количество посевного материала (10^4 – 10^5 кл/мл) составляло 5–10 % от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30 °С в течение 120 ч.

ПАВ выделяли из супернатанта культуральной жидкости экстракцией смесью хлороформа и метанола в соотношении 2:1 (смесь Фолча), как описано в нашей работе [12].

Антимикробную активность поверхностно-активных веществ анализировали по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК), которую определяли методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ) для бактерий и в жидком сусле для дрожжей, как описано нами ранее [13].

Исследование антиадгезивных свойств осуществляли согласно методике, описанной нами в работе [12]. Количество адгезированных клеток определяли спектрофотометрическим методом как отношение оптической плотности суспензии, полученной из обработанных ПАВ материалов (линолеум (поливинилхлорид), кафель, нержавеющая сталь, пластик) к оптической плотности контрольных (без обработки ПАВ) образцов и выражали в процентах.

Исследование влияния ПАВ на разрушение биопленки осуществляли, как описано в работе [14]. Для формирования биопленки в полистирольные микропланшеты вносили 180 мкл МПБ (жидкого суслу) и 20 мкл суспензии односточной тест-культуры, инкубировали в течение 24 ч при оптимальной для тест-культуры температуре, после чего культуральную жидкость сливали, вносили 180 мкл свежего МПБ (жидкого суслу) и 20 мкл суспензии тест-культуры и инкубировали в течение последующих 24 ч. В работе [14] установлено, что такого выращивания в течение 48 ч достаточно для формирования биопленки в лунках микропланшетов. Через 48 ч культуральную жидкость сливали, а в лунки микропланшетов (с предварительно сформированной на них биопленкой тест-культуры) вносили по 200 мкл препаратов ПАВ различной концентрации. В контрольные варианты (лунки) вместо препаратов ПАВ вносили стерильную водопроводную воду (200 мкл). Через 24 ч экспозиции лунки трижды промывали 200 мкл дистиллированной воды и с помощью спектрофотометрического метода рассчитывали, так же как и при определении антиадгезивных свойств, количество адгезированных клеток [14]. О степени разрушения биопленки (%) судили по разнице между адгезией клеток в необработанных и обработанных ПАВ лунках полистирольного планшета.

В качестве тест-культур при определении антимикробных и антиадгезивных свойств ПАВ использовали штаммы бактерий (*Escherichia coli* ИЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Enterobacter cloacae* С-8, *Proteus vulgaris* ПА-12) и дрожжей (*Candida albicans* Д-6 и *Candida utilis* ИЕ-8) из коллекции живых культур кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [12]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные по минимальной ингибирующей концентрации ПАВ, синтезированных при выращивании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на базовых и модифицированных средах. Результаты экспериментов показали, что повышение в среде культивирования всех исследуемых штаммов-продуцентов ПАВ концентрации активаторов НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы сопровождалось образованием ПАВ, антимикробная активность которых по отношению к бактериальным тест-культурам была в 1,2–13 раз ниже, чем ПАВ, полученных на базовой среде. Наиболее существенным (в 7,2–13 раз) было снижение показателя МИК по отношению к *E. cloacae* С-8, *P. vulgaris* ПА-12 и *S. aureus* БМС-1 ПАВ, синтезированных *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (табл. 1). Отметим, что ПАВ, образуемые *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на базовой среде, практически не проявляли антимикробной активности по отношению к *C. albicans* Д-6 (МИК >480 мкг/мл), в то время как минимальная ингибирующая концентрация синтезированных на модифицированной среде ПАВ снижалась до 20 мкг/мл. МИК по отношению к этой дрожжевой тест-культуре ПАВ, образуемых *N. vaccinii* ИМВ В-7405, на базовой и модифицированной среде составляла 90 и 25 мкг/мл соответственно (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Антимикробная активность поверхностно-активных веществ, синтезированных в различных условиях культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *N. vaccinii* ИМВ В-7405 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017

Table 1. Antimicrobial activity of surfactants synthesized under various cultivation conditions of *A. calcoaceticus* IMV В-7241, *N. vaccinii* IMV В-7405 and *R. erythropolis* IMV Ас-5017

Штамм	Среда культивирования	Минимальная ингибирующая концентрация (мкг/мл) по отношению к бактериальным тест-культурам					
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Escherichia coli</i> ИЕМ-1	<i>Candida albicans</i> Д-6
<i>A. calcoaceticus</i> ИМВ В-7241	Базовая	14	56	14	14	28	Н. о.
	Модифицированная среда 1	4	32	8	8	16	Н. о.
	Модифицированная среда 2	4	12	8	8	12	Н. о.
<i>N. vaccinii</i> ИМВ В-7405	Базовая	90	180	90	90	45	90
	Модифицированная	50	25	6,8	12,5	12,5	25
<i>R. erythropolis</i> ИМВ Ас-5017	Базовая	60	240	Н. о.	Н. о.	15	>480
	Модифицированная	25	50	Н. о.	Н. о.	12,5	20

П р и м е ч а н и е. Н. о. – не определяли; при определении минимальной ингибирующей концентрации погрешность не превышала 5 %. Состав базовых и модифицированных сред указан в разделе «Объекты и методы исследования».

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о возможности повышения антимикробной активности ПАВ в процессе культивирования продуцентов на модифицированной среде, содержащей активаторы ключевого фермента биосинтеза поверхностно-активных амфолипидов. Отметим, что в доступной литературе нам не удалось обнаружить подобных сведений. Встречаются отдельные работы, в которых установлена зависимость антимикробных свойств ПАВ от условий культивирования продуцента, например от природы источника углерода [9]. Однако в этой работе авторы только констатировали факт влияния природы источника углеродного питания на проявление антифунгальных свойств синтезируемых ПАВ, не объясняя механизмов, лежащих в основе этого явления.

В другой работе [8] исследовали биологические свойства липопептидов *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Установлено, что только две фракции комплекса из шести (бацитрацин Д и фенгицин) проявляли антифунгальное действие на *Fusarium oxysporum*, причем бацитрацин оказался более сильным антимикробным агентом. Исследователи получили генно-инженерные штаммы SQR9M1 и SQR9M2, синтезирующие только фенгицин и бацитрацин. Липопептид штамма SQR9M1 не проявлял антифунгального действия. Добавление очищенного бацитрацина к фенгицину сопровождалось возобновлением антифунгального эффекта. Эти результаты свидетельствуют о возможности регуляции свойств микробных липопептидов с использованием генно-инженерных штаммов, синтезирующих только определенные составляющие комплекса ПАВ.

Известно, что механизм антимикробного действия ПАВ состоит в нарушении целостности цитоплазматической мембраны тест-культур, что приводит к потере клеткой жизнеспособности [16]. Литературные данные [16] свидетельствуют, что антиадгезивная активность ПАВ может быть обусловлена повышением проницаемости клеточной мембраны, а также изменением поверхностного заряда клеток и, как следствие, нарушением их биологических функций. В связи с этим на следующем этапе исследовали антиадгезивные свойства ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 в различных условиях культивирования (табл. 2).

Установлено, что после обработки абиотических материалов растворами ПАВ, синтезированных исследуемыми штаммами на модифицированных средах, адгезия *B. subtilis* БТ-2 и *E. coli* IEM-1 снижалась на 10–33 и 12–40 % соответственно по сравнению с таковой на поверхностях, обработанных препаратами, полученными на базовой среде. Количество дрожжевых клеток, прикрепленных к различным материалам после их обработки растворами ПАВ, синтезированных *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на модифицированной среде, снижалось на 8–14 и 25–55 % соответственно по сравнению с аналогичными показателями на поверхностях, обработанных полученными на базовой среде ПАВ.

Т а б л и ц а 2. Влияние ПАВ, синтезированных в различных условиях культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017, на прикрепление микроорганизмов к абиотическим поверхностям

Table 2. The effect of surfactants, synthesized under various cultivation conditions of *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV Ac-5017, on attachment of microorganisms to abiotic surfaces

Продуцент ПАВ	Тест-культура	Среда культивирования	Адгезия, %			
			Пластик	Кафель	Сталь	Поливинилхлорид
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	29	48	30	36
		Модифицированная среда 1	16	20	16	19
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	64	54	45	76
		Модифицированная	31	44	30	Н. о.
	<i>Escherichia coli</i> IEM-1	Базовая	53	93	45	28
		Модифицированная	36	54	31	11
	<i>Candida albicans</i> Д-6	Базовая	56	63	55	45
		Модифицированная	48	51	42	31
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	Н. о.	95	95	82
		Модифицированная	Н. о.	69	71	51
	<i>Escherichia coli</i> IEM-1	Базовая	70	43	76	76
		Модифицированная	36	20	64	36
	<i>Candida albicans</i> Д-6*	Базовая	65	36	95	85
		Модифицированная	35	11	47	30

Примечание. Н. о. – не определяли, концентрация растворов ПАВ 5 мкг/мл; * – концентрация раствора ПАВ 50 мкг/мл. При определении адгезии погрешность не превышала 5 %. Состав базовых и модифицированных сред указан в разделе «Объекты и методы исследования».

В доступной литературе нам удалось обнаружить несколько сообщений, в которых обсуждается зависимость химического состава ПАВ и их антиадгезивных свойств. Так, в работе [17] показано, что фракция-1 липопептидных ПАВ *B. licheniformis* V9T14 в концентрации 0,08 мг/мл

ингибировала адгезию *E. coli* CFT073 на полистироловые пластинки на 50 %, а фракция-2 в такой же концентрации – на 90–95 %. В присутствии двух фракций липопептидов *B. subtilis* V19T21 (35 мкг/мл) адгезии *E. coli* CFT073 не наблюдали [17]. Предварительные исследования показали, что фракция-2 обоих штаммов представляет собой ПАВ, принадлежащее к фенгицин-подобным ПАВ. В работе [17] отмечается, что именно фракция-2 является ответственной за антиадгезивные свойства синтезируемых *B. licheniformis* V9T14 и *B. subtilis* V19T21 комплексов. Позже было установлено, что фракция-1 штамма V9T14 содержит C13–C15 гомологи сурфактина, а фракция-2 – C14–C17-гомологи фенгицина [18]. Отметим, что в работах [17, 18] авторы не исследовали зависимость химического состава липопептидов от условий культивирования продуцентов.

Антимикробные и антиадгезивные свойства рамнолипидов, синтезируемых *Pseudomonas* sp. рур41, *Pseudomonas aeruginosa* LCD12 и *P. aeruginosa* D2, зависят от соотношения моно- и дирамнолипидов в комплексе ПАВ [19]. К сожалению, авторы не изучали влияние условий культивирования штаммов на химический состав и свойства ПАВ.

Литературные данные последних лет, обобщенные нами в обзоре [20], свидетельствуют, что микробные ПАВ способны не только предупреждать адгезию микроорганизмов на различных материалах, но и разрушать образованные на них биопленки.

Данные по влиянию ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405, на разрушение биопленок, представлены в табл. 3. Повышение в среде культивирования всех штаммов-продуцентов ПАВ содержания активаторов НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы сопровождалось образованием ПАВ, в присутствии которых степень деструкции биопленок исследуемых тест-культур увеличивалась, причем наиболее существенным (в среднем на 15–30 %) было повышение деструкции биопленки *B. subtilis* БТ-2. Отметим, что разрушение биопленок наблюдали при достаточно низкой концентрации ПАВ (8–64 мкг/мл) (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Разрушение биопленок в присутствии ПАВ, синтезированных при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 в средах различного состава
T a b l e 3. Destruction of biofilms in the presence of surfactants synthesized under cultivation of *A. calcoaceticus* IMV B-7241, *N. vaccinii* IMV B-7405 and *R. erythropolis* IMV As-5017 in the media of different composition

Продуцент ПАВ	Тест-культура	Среда культивирования	Разрушение биопленки (%) после обработки ПАВ (мкг/мл)			
			8	16	32	64
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	20	34	43	69
		Модифицированная	40	57	67	73
	<i>Escherichia coli</i> ИЕМ-1	Базовая	46	44	36	28
		Модифицированная	53	50	43	34
	<i>Candida albicans</i> Д-6	Базовая	49	53	57	59
		Модифицированная	55	63	64	65
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	28	29	31	33
		Модифицированная среда 1	43	45	45	55
	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	Базовая	3	14	17	18
		Модифицированная среда 1	17	20	28	30
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Базовая	11	23	49	63
		Модифицированная	31	63	86	91
	<i>Escherichia coli</i> ИЕМ-1	Базовая	84	79	79	78
		Модифицированная	87	84	82	80
	<i>Candida utilis</i> ИЕ-8	Базовая	7	4	4	5
		Модифицированная	11	15	17	19

П р и м е ч а н и е. При определении степени разрушения биопленок погрешность не превышала 5 %. Состав базовых и модифицированных сред указан в разделе «Объекты и методы исследования».

В работе Das с соавт. [19] показано, что рамнолипиды *P. aeruginosa* IMP67 в концентрации 64 мкг/мл разрушали на 50 % образованную на полистироловой поверхности биопленку *B. subtilis* R16. В присутствии ПАВ *Saccharomyces cerevisiae* D3 (100 мкг/мл) наблюдали деструкцию

биоупленки *B. subtilis* BT37 на 30 % [21]. Наши эксперименты показали, что ПАВ, синтезированные *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на модифицированной среде, являются более эффективными деструкторами биоупленки *B. subtilis* по сравнению с ПАВ *S. cerevisiae* D3 и рhamnолипидами *P. aeruginosa* IMP67.

Степень разрушения биоупленки *E. coli* IEM-1 и *C. albicans* Д-6 в присутствии ПАВ, синтезированных *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на модифицированной среде, составляла (в зависимости от концентрации ПАВ) 34–53 и 55–65 % соответственно (табл. 3). Отметим, что независимо от условий культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 и концентрации ПАВ полученные препараты разрушали биоупленку *E. coli* IEM-1 на 79–87 %. Существенно ниже была степень деструкции биоупленки *C. utilis* IE-8 в присутствии ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405, однако ПАВ, полученные на модифицированной среде, разрушали биоупленку этой тест-культуры на 11–19 %, в то время как синтезированные на базовой среде – всего на 4–7 % (табл. 3).

Заключение. Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о возможности увеличения антимикробной и антиадгезивной активности микробных ПАВ в процессе культивирования продуцентов на модифицированных средах с повышенным содержанием активаторов ключевого фермента биосинтеза поверхностно-активных аминоклипов. В перспективе это позволит получать продукты со стабильными и, в зависимости от сферы их практического использования, заранее заданными свойствами.

Необходимость получения микробных ПАВ с заданными свойствами обусловлена тем, что в зависимости от области практического использования препаратов (природоохранные технологии, сельское хозяйство, медицина и др.) их биологические свойства должны быть различными. Так, например, для деструкции нефтяных загрязнений в воде и почве целесообразно применять ПАВ, обладающие высокой антимикробной активностью. Это обусловлено тем, что основным механизмом повышения деструкции нефти в присутствии ПАВ является солиubilизация углеводов нефти и, как следствие, активация природной нефтеокисляющей микробиоты, на которую те же ПАВ могут оказывать и антимикробное действие [22]. Эффективные антимикробные и антиадгезивные свойства микробных ПАВ могут быть успешно использованы, например, в составе дезинфицирующих и моющих средств [7, 23] либо в растениеводстве для контроля численности фитопатогенных микроорганизмов [23].

Список использованных источников

1. Sekhon Randhawa, K. K. Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market / K. K. Sekhon Randhawa, P. K. Rahman // *Frontiers Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>
2. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants / B. N. Paulino [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100, N 24. – P. 10265–10293. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>
3. Claus, S. Sphorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research / S. Claus, I. N. A. van Bogaert // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 101, N 21. – P. 7811–7821. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8519-7>
4. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractios) / S. Itoh [et al.] // *J. Antibiot.* – 1971. – Vol. 24, N 12. – P. 855–859. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.855>
5. Mireles, J. R. Salmonella enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation / J. R. Mireles, A. Toguchi, R. M. Harshey // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183, N 20. – P. 5848–5854. <https://doi.org/10.1128/jb.183.20.5848-5854.2001>
6. Irie, Y. Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids disperse Bordetella bronchiseptica biofilms / Y. Irie, G. A. O’Toole, M. H. Yuk // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 250, N 2. – P. 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.012>
7. Mandal, S. M. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry / S. M. Mandal, A. E. A. D. Barbosa, O. L. Franco // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol. 31, N 2. – P. 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.004>
8. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation / Z. Xu [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 79, N 3. – P. 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
9. Singh, A. K. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2 / A. K. Singh, R. Rautela, S. S. Cameotra // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – Vol. 13, N 1. – P. 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>
10. Rhamnolipids from non-pathogenic Burkholderia thailandensis E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens / M. Elshikh [et al.] // *New Biotechnology*. – 2017. – Vol. 36. – P. 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>
11. Влияние катионов на активность НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы у бактерий родов *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и *Nocardia* – продуцентов поверхностно-активных веществ / Т. П. Пирог [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 4. – С. 67–74.

12. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / T. P. Pirog [et al.] // *Microbiology*. – 2014. – Vol. 83, N 6. – P. 732–739. <https://doi.org/10.1134/S0026261714060150>
13. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants // T. P. Pirog [et al.] // *Biotechnology Acta*. – 2016. – Vol. 9, N 1. – P. 38–47. <https://doi.org/10.15407/biotech9.01.038>
14. Zezzi do Valle Gomes, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria / M. Zezzi do Valle Gomes, M. Nitschke // *Food Control*. – 2012. – Vol. 25, N 2. – P. 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>
15. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 57, N 4. – P. 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1024>
16. Kalyani, R. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective / R. Kalyani, M. Bishwambhar, V. Suneetha // *Int. Res. J. of Pharmacy*. – 2011. – Vol. 2, N 8. – P. 11–15.
17. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens / F. Rivardo [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 83, N 3. – P. 541–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1987-7>
18. LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain / Y. Pecci [et al.] // *J. Mass Spectrom.* – 2010. – Vol. 45, N 7. – P. 772–778. <https://doi.org/10.1002/jms.1767>
19. Das, P. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity / P. Das, X.-P. Yang, L. Z. Ma // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – Art. 696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00696>
20. Pirog, T. P. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents / T. P. Pirog, I. V. Savenko, D. A. Lutsay // *Biotechnologia Acta*. – 2016. – Vol. 9, N 3. – P. 7–22. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.007>
21. Jolly, M. J. Inhibitory effect of biosurfactant purified from probiotic yeast against biofilm producers / M. J. Jolly // *J. of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*. – 2013. – Vol. 6, N 1. – P. 51–55. <https://doi.org/10.9790/2402-0615155>
22. Lawniczak, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation / Ł. Lawniczak, R. Marecik, Ł. Chrzanowski // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, N 6. – P. 2327–2339. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4740-1>
23. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine / J. Chen [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 101, N 23–24. – P. 8309–8319. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8554-4>

References

1. Sekhon Randhawa K. K., Rahman P. K. Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, p. 454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>
2. Paulino B. N., Pessôa M. G., Mano M. C., Molina G., Neri-Numa I. A., Pastore G. M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100, no. 24, pp. 10265–10293. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>
3. Claus S., Van Bogaert I. N. A. Sophorolipid production by yeasts: a critical review of the literature and suggestions for future research. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 101, no. 21, pp. 7811–7821. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8519-7>
4. Itoh S., Honda H., Tomita F., Suzuki T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractios). *Journal of Antibiotics*, 1971, vol. 24, no. 12, pp. 855–859. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.24.855>
5. Mireles J. R., Toguchi A., Harshey R. M. Salmonella enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 2001, vol. 183, no. 20, pp. 5848–5854. <https://doi.org/10.1128/jb.183.20.5848-5854.2001>
6. Irie Y., O’Toole G. A., Yuk M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 250, no. 2, pp. 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.012>
7. Mandal S. M., Barbosa A. E. A. D., Franco O. L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, 2013, vol. 31, no. 2, pp. 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.004>
8. Xu Z., Shao J., Li B., Yan X., Shen Q., Zhang R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, vol. 79, no. 3, pp. 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
9. Singh A. K., Rautela R., Cameotra S. S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microbial Cell Factories*, 2014, vol. 13, no. 1, p. 67. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-67>
10. Elshikh M., Funston S., Chebbi A., Ahmed S., Marchant R., Banat I. M. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: physicochemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *New Biotechnology*, 2017, vol. 36, pp. 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.009>
11. Pirog T. P., Shevchuk T. A., Savenko I. V., Lutsai D. A. Influence of cations on NADP-dependent glutamate dehydrogenase activity in bacteria of genera *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Nocardia* – producers of surfactants. *Vestsi Natsyyanal’nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 67–74 (in Russian).
12. Pirog T. P., Konon A. D., Beregovaya K. A., Shulyakova M. A. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Microbiology*, 2014, vol. 83, no. 6, pp. 732–739. <https://doi.org/10.1134/S0026261714060150>

13. Pirog T. P., Panasyuk E. V., Nikityuk L. V., Iutinska G. O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia Acta*, 2016, vol. 9, no. 1, pp. 38–47. <https://doi.org/10.15407/biotech9.01.038>
14. Zezzi do Valle Gomes M., Nitschke M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 2012, vol. 25, no. 2, pp. 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>
15. Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, vol. 57, no. 4, pp. 609–618. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1024>
16. Kalyani R., Bishwambhar M., Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective. *International Research Journal of Pharmacy*, 2011, vol. 2, no. 8, pp. 11–15.
17. Rivardo F., Turner R. J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 83, no. 3, pp. 541–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1987-7>
18. Pecci Y., Rivardo F., Martinotti M. G., Allegrone G. LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010, vol. 45, no. 7, pp. 772–778. <https://doi.org/10.1002/jms.1767>
19. Das P., Yang X.-P., Ma L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Frontiers in Microbiology*, 2014, vol. 5, art. 696. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00696>
20. Pirog T. P., Savenko I. V., Lutsay D. A. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents. *Biotechnologia Acta*, 2016, vol. 9, no. 3, pp. 7–22. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.007>
21. Jolly M. J. Inhibitory effect of biosurfactant purified from probiotic yeast against biofilm producers. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 2013, vol. 6, no. 1, pp. 51–55. <https://doi.org/10.9790/2402-0615155>
22. Ławniczak Ł., Marecik R., Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 97, no. 6, pp. 2327–2339. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4740-1>
23. Chen J., Wu Q., Hua Y., Chen J., Zhang H., Wang H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 101, no. 23–24, pp. 8309–8319. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8554-4>

Інформація об авторах

Пирог Тат'яна Павлівна – д-р біол. наук, вед. науч. сотрудник, професор, завідує кафедрою. Національний університет пищевих технологій (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Київ, Україна). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Шевчук Тат'яна Андріївна – вед. інженер. Інститут мікробіології та вірусології НАН України (ул. Академіка Заболотного, 154, 03143, г. Київ, Україна)

Никитюк Лилія Вікторівна – аспірант. Національний університет пищевих технологій (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Київ, Україна). E-mail: liya.nikityuk@ukr.net

Луцай Дар'я Андріївна – студент. Національний університет пищевих технологій (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Київ, Україна). E-mail: lutaйда0@ukr.net

Палийчук Олесь Ігорівна – аспірант. Національний університет пищевих технологій (ул. Владимирская, 68, 01601, г. Київ, Україна). E-mail: olesiapaliichuk@gmail.com

Information about the authors

Tat'yana P. Pirog – D. Sc. (Biol.), Leading researcher, Professor, Head of the Department. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Tat'yana A. Shevchuk – Leading Engineer. Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine (154, Academician Zabolotny Str., 03143, Kiev, Ukraine)

Liliya V. Nikityuk – Postgraduate student. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: liya.nikityuk@ukr.net

Dar'ya A. Lutsai – Student. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: lutaйда0@ukr.net

Olesya I. Paliichuk – Postgraduate student. National University of Food Technologies (68, Vladimirska Str., 01601, Kyiv, Ukraine). E-mail: olesiapaliichuk@gmail.com