

АНТИМІКРОБНА ТА АНТИАДГЕЗИВНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 НА ТЕХНІЧНОМУ ГЛІЦЕРИНІ

Т.П. Пирог^{1,2}, Д.А. Луцай¹, Т.А. Шевчук²,
Г.О. Іутинська², І.В. Ельперін¹

¹ Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

² Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: tapirog@nift.edu.ua

Мета. Порівняння біологічних властивостей (антимікробної та антиадгезивної активності, у тому числі й роль у руйнуванні біоплівки) поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному та технічному гліцерині (відходи виробництва біодизелю). **Методи.** Поверхнево-активні речовини екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Кількість адгезованих клітин і ступінь руйнування біоплівки визначали спектрофотометричним методом, антимікробні властивості – за показником мінімальної інгібуючої концентрації. **Результати.** Антимікробна активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на технічному гліцерині, була на 1–2 порядки нижчою, адгезія тест-культур на абіотичних матеріалах, оброблених такими препаратами – в 1,2–4 рази нижчою, а ступінь руйнування бактеріальних біоплівок – в 1,3–4 рази меншою порівняно з показниками, встановленими для поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі з еквімолярною за вуглецем концентрацією очищеного гліцерину. Зниження антимікробної та антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин може бути зумовлене інгібуючим впливом надлишкової концентрації K^+ та Na^+ (складових технічного гліцерину) на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази: за наявності в реакційній суміші 50–100 мМ катіонів калію та натрію ферментативна активність знижувалась в 1,2–1,8 рази. **Висновки.** Незважаючи на нижчу антимікробну та антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю, ці показники (мінімальні інгібуючі концентрації 0,96–15,2 мкг/мл, руйнування 50 % біоплівки при концентрації 124 мкг/мл) є співставимими із визначеними для відомих мікробних поверхнево-активних амінолілідів.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, поверхнево-активні речовини, біологічні властивості, відходи виробництва біодизелю.

У попередніх дослідженнях [1, 2] було встановлено залежність антимікробної та антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) від наявності у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 факторів росту і певних мікроелементів, а також природи джерела вуглецевого живлення (етанол, очищений гліцерин,

n-гексадекан). У роботі [3] було встановлено можливість синтезу ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині (гліцерина фракція), який є відходом виробництва біодизелю.

З літератури [4, 5] відомо, що зберігання технічного гліцерину є потенційною екологічною проблемою через підвищену лужність та вміст залишків токсичного метанолу, високих концентрацій солей і вільних жирних кислот. Промислове застосування цього відходу у традиційних сферах (харчовій, тютюновій, фармацевтичній і косметичній промисловості) вимагає вартісного процесу переробки з метою досягнення необхідної високої чистоти ($\geq 99\%$).

Наявність у складі відходів виробництва біодизелю токсичних компонентів може негативно впливати на якість синтезованих цільових продуктів. Наші попередні дані засвідчують, що не завжди підвищення синтезу ПАР супроводжується утворенням цільового продукту з необхідними біологічними властивостями, що потребує проведення досліджень залежності властивостей поверхнево-активних речовин від умов культивування продуцента [1, 2].

Мета даної роботи – порівняння біологічних властивостей (антимікробної та антиадгезивної активності, у тому числі й роль у руйнуванні біоплівки) поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному та технічному гліцерині (відходи виробництва біодизелю).

Матеріали і методи. Основним об'єктом досліджень був продуцент ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7241.

Як тест-культури під час визначення біологічних властивостей ПАР використовували бактерії *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 (вегетативні і спорові клітини, вирощені упродовж 12 і 24 год відповідно), *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Enterobacter cloacae* С-8, *Leuconostoc mesenteroides* ПБ-7; дріжджі *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* ЕІ-8 і мікроміцети *Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}_3$ – 0,35; NaCl – 1,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; вода дистильована – до 1 л, рН 6,8–7,0. У середовище також додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка), що містить (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; H_3BO_3 – 0,006; KI – 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) – 0,5. Як джерело вуглецю використовували очищений або технічний гліцерин (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.). Для досягнення еквімолярної концентрації обох субстратів за вуглицем їх об'ємні частки становили 3 та 5 % відповідно.

Посівний матеріал – культура в середині експоненційної фази росту, вирощена у середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5 %

очищеного або технічного гліцерину. Кількість інокуляту з титром $10^4 - 10^5$ клітин/мл становила 5 % від об'єму середовища.

Культивування здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 120 год.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини, екстраговані з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хло-роформ і метанол, 2:1), як описано у нашій попередній роботі [6].

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і у рідкому суслі – для дріжджів і грибів, як описано нами раніше [2].

Визначення антиадгезивних властивостей ПАР здійснювали, як описано у роботі [7]. Кількість адгезованих клітин (ступінь адгезії) визначали спектрофотометричним методом як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР матеріалів (кахель, сталь, лінолеум), до оптичної густини контрольних зразків (без обробки ПАР) і виражали у відсотках.

Дослідження впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали, як описано у роботі [8]. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл м'ясо-пептонного бульйону чи рідкого су-сла та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі. Після цього куль-туральну рідину зливали і вносили 180 мкл свіжого МПБ (рідкого су-сла) і 20 мкл суспензії тест-культури і повторно інкубували впродовж наступ-них 24 год. У роботі [8] зазначається, що вирощування мікроорганізмів упродовж 48 год згідно описаної методики є достатнім для формуван-ня біоплівки у лунках мікропланшети. Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета (з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури) вносили по 200 мкл препаратів ПАР різної кон-центрації (0,95-124 мкг/мл). У контрольні лунки замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом [7]. Ступінь руйну-вання біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необро-блених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину центри-фугували (5000 g, 20 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (pH 7,0) (4000 g, 15 хв, 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували у 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (pH 7,0) і руйнували ультразвуковою обробкою (22 кГц) 3 рази по 20 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4°C), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

НАДФ⁺-залежну глутаматдегідрогеназну активність (КФ 1.4.1.4) у без-клітинному екстракті визначали за утворенням глутамату під час окиснен-ня НАДФН при 340 нм [9].

Під час дослідження впливу катіонів натрію і калію на НАДФ⁺-залежну глутаматдегідрогеназну активність у реакційну суміш вносили 25–100 мМ розчинів солей NaCl та KCl. Ферментативну активність виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [10]. Ферментативну активність аналізували при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано раніше [3, 6]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати. У табл. 1 наведено дані щодо антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих штамом ІМВ В-7241 *A. calcoaceticus* на очищеному і технічному гліцерині.

Таблиця 1

Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 при вирощуванні на очищеному і технічному гліцерині

Тест-культури		МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих на гліцерині	
		очищеному	технічному
Бактерії	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	0,24	0,96
	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (споріві клітини)	3,8	15,2
	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	0,48	3,8
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	0,96	3,8
	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	3,8	7,6
Дріжджі	<i>Candida albicans</i> Д-6	1,9	15,2
	<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	3,8	7,6
	<i>Candida utilis</i> ЕІ-8	1,9	7,6
Гриби	<i>Aspergillus niger</i> Р-3	0,06	3,8
	<i>Fusarium culmorum</i> Т-7	0,03	1,9

Примітка. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %.

Антимікробна активність розчинів ПАР, синтезованих на технічному гліцерині, щодо бактеріальних та дріжджових тест-культур була у 2–8 разів нижчою порівняно з встановленою для поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному субстраті. Суттєвішою була різниця у показниках мінімальних інгібуючих концентрацій цих ПАР щодо грибів: антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, була більш ніж у 60 разів нижчою, ніж ПАР, утворених на очищеному гліцерині.

Подальші експерименти показали, що ПАР, синтезовані на технічному гліцерині, характеризувалися нижчою антиадгезивною активністю порівняно з препаратами, одержаними на очищеному субстраті (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив ПАР, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному і технічному гліцерині, на прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь

Матеріали	Тест-культури	Відсоток адгезії мікроорганізмів після обробки матеріалів розчинами ПАР, синтезованих на гліцерині	
		очищеному	технічному
Кахель	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	21	85
	<i>Enterobacter cloaceae</i> С-8	46	68
	<i>Candida albicans</i> Д-6	21	34
Сталь	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	23	80
	<i>Enterobacter cloaceae</i> С-8	39	80
	<i>Candida albicans</i> Д-6	61	76
Лінолеум	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7	26	54
	<i>Enterobacter cloaceae</i> С-8	35	87
	<i>Candida albicans</i> Д-6	69	86

Примітка. Концентрація ПАР у розчинах становила 5 мкг/мл. Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %.

Так, адгезія *L. mesenteroides* ПБ-7, *E. cloaceae* С-8, *C. albicans* Д-6 на досліджуваних абіотичних поверхнях, оброблених розчинами поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, була у 1,6–4 рази вищою, ніж після обробки ПАР, отриманих на очищеному гліцерині. У табл. 2 наведено дані щодо впливу на прикріплення мікроорганізмів до різних поверхонь, оброблених препаратами з концентрацією ПАР 5 мкг/мл. Зазначимо, що у разі зниження концентрації поверхнево-активних речовин до 2,5 мкг/мл їх антиадгезивна активність практично не змінювалася. Крім того, адгезія бактеріальних тест-культур на усіх поверхнях, оброблених ПАР, синтезованими на очищеному гліцерині, становила 21–46 %, у той час як після використання речовин, одержаних на відходах виробництва біодизелю, підвищувалася до 54–87 %.

У табл. 3 наведено дані щодо руйнування біоплівки за дії розчинів ПАР, синтезованих на очищеному та технічному гліцерині. Максимальна деструкція біоплівки *E. cloaceae* С-8 (38–43 %) під впливом розчинів поверхнево-активних речовин, утворених на відходах виробництва біодизелю, спостерігалася за концентрації ПАР 62–124 мкг/мл, у той час як аналогічний ступінь її руйнування досягався за нижчої на 2–3 порядки концентрації ПАР, одержаних на очищеному гліцерині (0,95–1,9 мкг/мл). Деструкція біоплівки *L. mesenteroides* ПБ-7 під впливом ПАР (124 мкг/мл), синтезованих на технічному гліцерині, була максимальною і становила 58 %, а за наявності поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному субстраті, підвищувалася до 76–80 % за концентрації ПАР 1,9–3,8 мкг/мл (табл. 3).

Зазначимо, що на відміну від біоплівки, утворюваної бактеріями *E. cloacae* С-8 і *L. mesenteroides* ПБ-7, руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 за наявності ПАР, синтезованих на технічному гліцерині, не спостерігали, причому в діапазоні усіх досліджуваних концентрацій поверхнево-активних речовин (0,95–124 мкг/мл). Деструкція біоплівки цієї тест-культури на рівні 37–47 % досягалася тільки за дії максимальної концентрації ПАР (62–124 мкг/мл), одержаних на очищеному гліцерині.

Таблиця 3
Вплив ПАР, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному і технічному гліцерині, на руйнування біоплівки

Гліцерин у середовищі культивування	Концентрація ПАР, мкг/мл	Відсоток руйнування біоплівки	
		<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ПБ-7
Технічний	0,95	10	Н.в.
	1,9	25	22
	3,9	29	24
	7,8	31	24
	15,5	33	25
	31	38	26
	62	38	47
	124	43	58
Очищений	0,95	40	30
	1,9	43	80
	3,9	45	76
	7,8	48	68
	15,5	48	62
	31	50	60
	62	52	51
	124	55	Н.в.

Примітка. Під час визначення ступеню руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %. Н.в. – не визначали.

Заключний етап досліджень був присвячений встановленню можливих причин, що зумовлюють різну антимікробну та антиадгезивну активність ПАР, синтезованих на технічному та очищеному гліцерині.

Згідно з літературними даними [11, 12], аміноліпіди є більш ефективними антимікробними агентами, ніж гліколіпіди, а нейтральні ліпіди характеризуються дуже слабкою антимікробною активністю. Аналіз антиадгезивних властивостей відомих мікробних ПАР, наведений нами у літогляді [13], показав, що аміноліпідам бактерій роду *Bacillus* притаманна також і вища антиадгезивна активність порівняно з гліколіпідами (рамно- і софороліпідами). Так, ефективна концентрація аміноліпідів, що забезпечує максимальну антиадгезивну активність, в середньому становить 2–50, а софороліпідів – 12–200 мкг/мл.

Раніше [6] було встановлено, що *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує комплекс гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів. Оскільки аміноліпідам притаманна вища антимікробна та антиадгезивна активність [11–13], можна припустити, що у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на

технічному гліцерині вміст аміноліпідів у складі синтезованого комплексу ПАР є нижчим, ніж одержаного на середовищі з очищеним субстратом. Однією з причин пригнічення синтезу аміноліпідів при вирощуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю може бути наявність у складі такого субстрату високої концентрації катіонів калію чи натрію [5] – потенційних інгібіторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів у цих бактерій [14].

Наступні експерименти підтвердили це припущення. Дані, наведені у табл. 4, засвідчують, що за наявності у реакційній суміші 50–100 мМ катіонів натрію або калію НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність у безклітинному екстракті *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 знижувалася відповідно в 1,2–1,8 та 1,2–1,4 рази порівняно із такою без додавання катіонів.

Обговорення. Мікробні поверхнево-активні речовини є препаратами мультифункціонального призначення, оскільки крім поверхнево-активних та емульгуювальних властивостей їм притаманна антимікробна та антиадгезивна дія (у тому числі й здатність до руйнування біоплівки) [15]. Зацікавленість ПАР мікробного походження як антимікробними агентами зумовлена підвищенням резистентності патогенних мікроорганізмів до антибіотиків та відомих біоцидів [11, 12].

Таблиця 4

НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність при різній концентрації в реакційній суміші одновалентних катіонів

Катіони	Концентрація катіонів в реакційній суміші, мМ	НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназна активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка
Без катіонів	0	345 ± 17
Na ⁺	25	305 ± 15
	50	290 ± 14
	100	189 ± 9
K ⁺	25	345 ± 17
	50	289 ± 14
	100	245 ± 12

Відомо, що механізм антимікробної дії ПАР полягає у порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани тест-культур, що призводить до втрати клітиною життєздатності [16]. Літературні дані [17] свідчать, що антиадгезивна дія ПАР може бути зумовлена підвищенням проникності клітинної мембрани, а також зміною поверхневого заряду клітин і, як наслідок, порушенням їх біологічних функцій.

Незважаючи на широкий спектр практично цінних властивостей мікробних ПАР, їх використання стримується високою собівартістю [15], а одним із підходів до здешевлення процесу отримання є синтез ПАР на промислових відходах, зокрема, на технічному гліцерині.

Разом з тим, наявність у складі технічного гліцерину сторонніх домішок, які пригнічують ріст мікроорганізмів, суттєво обмежує його використання як ростового субстрату у мікробних біотехнологіях. Для змен-

шення негативного впливу даних домішок дослідниками запропоновано різні стратегії попередньої обробки цього субстрату. Зокрема, осадження та видалення залишкових жирних кислот досягається обробкою соляною кислотою [18] або органічними розчинниками (гексан, гептан, октан, петролейний ефір і *n*-гексанол) [19]. Іншими можливими підходами для зменшення/запобігання негативного впливу домішок технічного гліцерину є попередня обробка активованим вугіллям [20] та іммобілізація клітин продуцента [21]. У більшості випадків після використання вказаних методів рівень синтезу цільових метаболітів підвищувався, що додатково підтверджувало інгібуючий вплив домішок, наявних у складі відходів виробництва біодизелю, на процес біосинтезу кінцевого продукту [22].

Зазначимо, що показники синтезу ПАР при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині були удвічі вищими порівняно з такими на середовищі, що містило еквімолярну за вуглецем концентрацію очищеного субстрату [3]. Суттєвою перевагою *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як продуцента ПАР на відходах виробництва біодизелю є можливість використання цього субстрату без попереднього очищення від токсичних домішок. Разом з тим результати, наведені у даній роботі, засвідчують, що заміна очищеного гліцерину у середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 на технічний призвела до зниження антимікробної та антиадгезивної активності синтезованих ПАР. Таке явище може бути зумовлено інгібуючим впливом одновалентних катіонів (складових відходів виробництва біодизелю) на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за ці властивості комплексу поверхнево-активних речовин.

Отримані результати відрізняються від встановлених нами раніше [23] для штаму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність якого підвищувалася в 1,3–2,3 рази за наявності 50–100 мМ катіонів калію та натрію, а також від літературних даних, згідно з якими вказані катіони є активаторами даного ферменту у деяких мікроорганізмів [24]. На відміну від *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, при культивуванні *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на технічному гліцерині спостерігали підвищення як рівня синтезу, так і показників антимікробної активності ПАР порівняно з вирощуванням штаму на очищеному субстраті [23].

Проте зазначимо, що, незважаючи на нижчі у кілька разів значення мінімальної інгібуючої концентрації ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю (табл. 1), ці показники (0,96–15,2 мкг/мл) є досить низькими і свідчать про високу антимікробну активність цих препаратів. Такі значення порівнянні навіть з активністю аміноліпідів – найактивніших антимікробних агентів серед поверхнево-активних речовин мікробного походження. Зокрема, МІК сурфактину, ітурину і поліпептину щодо різних штамів *E. coli* становить 15,6; > 300 і 3,1–12,5 мкг/мл відповідно; МІК поліпептину і октапептину щодо *Proteus vulgaris* – 50–100 і 6,3 мкг/мл відповідно; МІК ітурину, поліпептину і октапептину щодо *S. aureus* – >400; 6,3 і 50 мкг/мл відповідно [12]. Мінімальна інгібуюча концентрація аміноліпиду, синтезованого *Streptomyces amritsarensis* sp. nov., щодо *B. subtilis* МТСС 619 не перевищувала 10 мкг/мл, а щодо *Staphylococcus epidermidis* МТСС 435 – 15 мкг/мл [25].

На відміну від антимікробної, антиадгезивна активність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на технічному гліцерині, була невисокою (адгезія тест-культур в середньому становила 70–80 %, табл. 2). Зазначимо, що у цих дослідженнях використовували ПАР у досить низьких концентраціях (2,5–5 мкг/мл). У той же час з літератури відомо, що максимальна антиадгезивна дія мікробних аміноліпідів досягається за їх середньої концентрації 2–50 мкг/мл [26, 27]. Крім того, адгезія мікроорганізмів на абіотичній поверхні залежить від багатьох факторів (концентрації клітин і природи їх поверхневих структур, властивостей матеріалу), а також і від концентрації ПАР [28]. Отже, цілком ймовірно, що у разі обробки поверхонь розчинами синтезованих на технічному гліцерині ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з концентрацією понад 5 мкг/мл їх антиадгезивна активність може виявитися вищою. Перевірка цього припущення буде предметом наших подальших досліджень.

Одержані результати показали, що ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині, у надзвичайно низьких концентраціях (0,95–1,9 мкг/мл) руйнували бактеріальні біоплівки на 40–80 % (табл. 3). Зазначимо, що у попередніх дослідженнях [13] ПАР штаму ІМВ В-7241 для руйнування біоплівки у таких низьких концентраціях не використовували (мінімальна досліджувана концентрація ПАР становила 20 мкг/мл). Це було зумовлено тим, що згідно з літературними даними ефективно руйнування біоплівок (понад 50 %) досягається за концентрації мікробних ПАР в діапазоні від 0,1 до 20–50 мг/мл [13]. Як свідчать наведені у табл. 3 дані, ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині, руйнували на 43–58 % бактеріальні біоплівки у концентрації, на два порядки нижчій (124 мкг/мл), ніж описана у літературі [13]. Крім того, аналіз даних табл. 3 дав змогу виявити нетипову кореляцію між концентрацією ПАР, одержаного на технічному гліцерині, і деструкцією біоплівки *L. mesenteroides* ПБ-7. Так, у разі збільшення концентрації ПАР з 0,95 до 1,9 мкг/мл руйнування біоплівки становило 30 і 80% відповідно, а при подальшому підвищенні концентрації ПАР деструкція знижувалася до 51%. Причини, що зумовлюють таке явище, залишаються невідомими, Проте, оскільки бактерії *L. mesenteroides* здатні до утворення полісахаридної капсули, можна припустити, що її наявність може впливати на доступність ПАР до клітин, що, в свою чергу, може призводити до отримання нетипових результатів.

У попередній роботі [2] було встановлено, що МІК ПАР, синтезованих на середовищі з 1% очищеного гліцерину, щодо *E. coli* ІЕМ-1, *C. albicans* Д-6 та спорових клітин *B. subtilis* БТ-2 становили 34–68 мкг/мл. Дані показники на 1–2 порядки вищі, ніж мінімальні інгібуючі концентрації, встановлені у даній роботі (табл. 1) для ПАР, одержаних на середовищі з 3% цього субстрату. Такі дані засвідчують, що не тільки природа джерела вуглецевого живлення (як встановлено раніше [2]), але і його концентрація впливають на властивості синтезованих ПАР.

У даній роботі ми досліджували біологічні властивості ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному та технічному гліцерині, причому концентрація обох субстратів у середовищі культивування була еквімолярною за вуглицем, що дає змогу коректніше оцінити залежність антимікробної та антиадгезивної активності цільового продукту від при-

роди джерела вуглецю у середовищі культивування продуцента. Такий самий підхід був використаний авторами праці [29], в якій досліджували антифунгальну активність аміноліпідів *Bacillus amylofaciens* AR2, одержаних на середовищі з еквімолярною за вуглецем концентрацією різних вуглеводів та гліцерину. Встановлено, що під час культивування штаму AR2 на декстрозі, сахарозі або гліцерині синтезувався комплекс сурфактину, ітуруину та фенгіцину, у той час як на мальтозі, лактозі і сорбітолі утворювався тільки ітурин. Максимальну антифунгальну активність щодо мікроміцетів родів *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* та ін. проявляли ПАР, синтезовані на сахарозі та декстрозі. Разом з тим у роботі [29] автори не намагалися в'янути причини, що зумовлюють зміни у складі комплексу поверхнево-активних аміноліпідів під час культивування продуцента на різних вуглецевих субстратах.

Таким чином, незважаючи на нижчу антимікробну та антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на відходах виробництва біодизелю, ці показники (МК 0,96–15,2 мкг/мл, руйнування 50 % біоплівки при концентрації ПАР 124 мкг/мл) є співставимими з визначеними для відомих мікробних поверхнево-активних аміноліпідів.

Зазначимо, що з кожним роком кількість публікацій, присвячених біосинтезу мікробних ПАР на технічному гліцерині, збільшується [30], проте у доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про антимікробні чи антиадгезивні властивості поверхнево-активних речовин, синтезованих на цьому субстраті.

Крім того, одержані нами результати вказують, що заміна очищеного гліцерину у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на технічний дає змогу, по-перше, підвищити рентабельність виробництва біодизелю, по-друге, утилізувати токсичні відходи, по-третє, здешевити процес біосинтезу ПАР.

АНТИМИКРОБНАЯ И АНТИАДГЕЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 НА ТЕХНИЧЕСКОМ ГЛИЦЕРИНЕ

Т.П. Пирог^{1,2}, Д.А. Луцай¹, Т.А. Шевчук,
Г.А. Иутинская², И.В. Эльперин¹

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Цель. Сравнение биологических свойств (антимикробной и антиадгезивной активности, в том числе и роль в разрушении биопленки) поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезированных на очищенном и техническом глицерине (отходы производства биодизеля). **Методы.** Поверхностно-активные вещества экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Количество адгезированных клеток и степень разру-

шения биопленки определяли спектрофотометрическим методом, антимикробные свойства – по показателю минимальной ингибирующей концентрации. **Результаты.** Антимикробная активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных на техническом глицерине, была на 1–2 порядка ниже, адгезия тест-культур на абиотических материалах, обработанных такими препаратами – в 1,2–4 раза ниже, а степень разрушения бактериальных биопленок – в 1,3–4 раза меньше по сравнению с показателями, установленными для поверхностно-активных веществ, полученных на среде с эквимольной по углероду концентрацией очищенного глицерина. Снижение антимикробной и антиадгезивной активности поверхностно-активных веществ может быть обусловлено ингибирующим влиянием избыточной концентрации K^+ и Na^+ (составляющих технического глицерина) на активность НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы: при наличии в реакционной смеси 50–100 ммоль катионов калия и натрия ферментативная активность снижалась в 1,2–1,8 раза. **Выводы.** Несмотря на более низкую антимикробную и антиадгезивную активность поверхностно-активных веществ, синтезированных *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на отходах производства биодизеля, эти показатели (минимальные ингибирующие концентрации 0,96–15,2 мкг/мл, разрушение 50% биопленки при концентрации 124 мкг/мл) сравнимы с установленными для известных микробных поверхностно-активных аминоклипидов.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, поверхностно-активные вещества, биологические свойства, отходы производства биодизеля.

ANTIMICROBIAL AND ANTI-ADHESIVE ACTIVITY OF SURFACTANTS SYNTHESIZED BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV V-7241 ON TECHNICAL GLYCEROL

T.P. Pirog^{1,2}, *D.A. Lutsai*¹, *T.A. Shevchuk*²,
*G.O. Iutyńska*², *I.V. Elperin*¹

¹ National University of Food Technologies,
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

Aim. Comparison of biological properties (antimicrobial and anti-adhesive activity, including role in biofilms destruction) of surfactants *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, synthesized on purified and technical glycerol (waste of biodiesel production). **Methods.** The surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid with a mixture of chloroform and methanol (2:1). The number of adherent cells and the degree of biofilm destruction were determined by the spectrophotometric method, the antimicrobial properties of the surfactants were analyzed by the minimum inhibitory concentration. **Results.** The antimicrobial activity of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants synthesized on technical glycerol was 1–2 orders lower, adhesion of test cultures on abiotic materials treated with such preparations was 1.2–4 times lower and degree of bacterial biofilms destruction – in 1,3–4 times less in comparison with the parameters established for surfactants, obtained on medium with equimolar by carbon concentration of purified

glycerol. The decreasing antimicrobial and anti-adhesive activity of the surfactants may be due to the inhibitory effect of K^+ and Na^+ excess concentration (components of technical glycerol) on the activity of NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase: in the presence of 50–100 mM of potassium and sodium cations enzymatic activity decreased in 1,2–1,8 times. **Conclusions.** Despite the lower antimicrobial and anti-adhesive activity of surfactants synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241 on waste of biodiesel production, these values (minimum inhibitory concentrations 0.96–15.2 µg/ml, degree of biofilms destruction by 50% at surfactants concentration of 124 µg/ml) are comparable with those established for known microbial surface-active aminolipids.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, surfactants, biological properties, waste of biodiesel production.

1. Pirog TP, Savenko IV, Shevchuk TA. [Effect of cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on surfactants antiadhesive properties]. Mikrobiol. Zh. 2016; 78(1): 2–12. Russian.
2. Pirog TP, Savenko IV, Shevchuk TA, Krutous NV, Iutyńska GO. [Antimicrobial properties surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241]. Mikrobiol. Zh. 2016; 78(3): 2–12. Ukrainian.
3. Pirog T, Shulyakova M, Sofilkanych A, Shevchuk T, Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. Food Bioprod. Proces. 2015; 93(1): 11–8.
4. Ciriminna R, Pina CD, Rossi M, Pagliaro M. Understanding the glycerol market. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2014; 116 (10): 1432–9. doi: 10.1002/ejlt.201400229.
5. Garlapati VK, Shankar U, Budhiraja A. Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. Biotechnol. Rep. (Amst). 2015; 9: 9–14. doi: 10.1016/j.btre.2015.11.002.
6. Pirog TP, Antonuk SI, Karpenko EV, Shevchuk TA. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis. Appl. Biochem. Microbiol. 2009; 45(3): 272–8. doi:10.1134/S0003683809030065.
7. Janek T, Lukaszewicz M, Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. BMC Microbiol. 2012; 12:24. doi: 10.1186/1471-2180-12-24.
8. Gomes M-ZV, Nitschke M. Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. Lett. Appl. Microbiol. 2012; 49(1): 960–5.
9. Sakamoto N, Kotre AM, Savageau MA. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. J. Bacteriol. 1975; 124(2): 775–83.
10. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72 (3): 248–54.
11. Cortes-Sanchez A, Hernandez-Sanchez H, Jaramillo-Flores M. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. Microbiol. Res. 2013; 168(1): 22–32.
12. Cochrane SA, Vederas JC. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a

- gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* 2016, 36(1), 4–31. doi 10.1002/med.21321.
13. Pirog TP, Savenko IV, Lutsay DA. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents. *Biotechnologia acta.* 2016; 9(3): 7–22. doi: org/10.15407/biotech9.03.007.
 14. Pirog TP, Shevchuk TA, Antoniuk SI, Kravchenko EYu., Iutynskaia GA. [Effect of univalent cations on synthesis of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241]. *Mikrobiol. Zh.* 2013; 75(2): 10–20. Russian.
 15. Santos DK., Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(3). doi: 10.3390/ijms17030401.
 16. Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57(4): 609–18.
 17. Kalyani R, Bishwambhar M, Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective. *Int. Res. J. Pharm.* 2011; 2(8): 11–5.
 18. Venkataramanan KP, Boatman JJ, Kurniawan Y, Taconi KA, Bothun GD, Scholz C. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 93(3): 1325–35. doi: 10.1007/s00253-011-3766-5.
 19. Anand P, Saxena RK. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *N. Biotechnol.* 2012; 29 (2): 199–205. doi: 10.1016/j.nbt.2011.05.010.
 20. Pott RW, Howe CJ, Dennis JS. The purification of crude glycerol derived from biodiesel manufacture and its use as a substrate by *Rhodospseudomonas palustris* to produce hydrogen. *Bioresour. Technol.* 2014; 152: 464–70. doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.094.
 21. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100 (3): 260–5.
 22. Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y. Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010; 161(1–8): 502–10. doi:10.1007/s12010-009-8859-6.
 23. Pirog TP, Nikituk LV, Iutynska GO. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on byproduct of biodiesel production]. *Mikrobiol. Zh.* 2016; 78(5): 12–20. Ukrainian.
 24. Bhuiya MW, Sakuraba H, Kujo C, Nunoura-Kominato N, Kawarabayasi Y, Kikuchi H, Ohshima T. Glutamate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1: enzymatic characterization, identification of the encoding gene, and phylogenetic implications. *Extremophiles.* 2000; 4(6): 333–41.
 25. Sharma D, Mandal SM, Manhas RK. Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *AMB Express.* 2014; 4. doi: 10.1186/s13568-014-0050-y.
 26. Rivardo F, Turner RJ, Allegrone G, Ceri H, Martinotti MG. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 83(3): 541–53.
 27. Sriram MI, Kalishwaralal K, Deepak V, Gracerosept R, Srisakthi K, Gurunathan S.

- Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2011; 85(2): 174–81.
28. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011; 9(2): 109–18.
29. Singh AK, Rautela R, Cameotra SS. Substrate dependent *in vitro* antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2. *Microb. Cell Fact.* 2014; 13. doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
30. Kalia VC, Prakash J, Koul S. Biorefinery for glycerol rich biodiesel industry waste. *Indian J. Microbiol.* 2016; 56(2): 113–25. doi: 10.1007/s12088-016-0583-7.

Отримано 10.07.2017