doi: https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013

УДК 579.663

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ІМВ Ac-5017 НА ВЛАСТИВОСТІ СИНТЕЗОВАНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Т.П. Пирог [1,2], Т.А. Шевчук [2], Н.М. Петренко [1], О.І. Палійчук [1], Г.О. Іутинська [2]

[1]Національний університет харчових технологій, вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна
[2]Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Мета. *Визначити умови культивування Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, що забезпечують синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) з високою антимікробною та антиадгезивною активностями, а також високою ефективністю деструкції нафтових забруднень.* ***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. Ступінь деструкції нафти аналізували за залишковою її концентрацією, яку визначали ваговим методом після екстракції гексаном.* ***Результати.*** *Встановлено, що активатором НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази (ключовий фермент біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів у R. erythropolis IMB Ac-5017) є катіони кальцію. Додаткове внесення $CaCl_2$ (0,1 г/л) у середовище культивування штаму IMB Ac-5017 супроводжувалося підвищенням НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності у два рази і синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо тест-культур були в 1,2−5 разів нижчими, їх адгезія на абіотичних матеріалах, оброблених такими ПАР, на 12−50 % нижчою, а ступінь руйнування біоплівок в середньому на 9−10 % вищою порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на базовому середовищі без Ca^{2+}. Внесення 0,1 мМ Cu^{2+} (активатор алкангідроксилази – першого ферменту катаболізму н-алканів) в експоненційній фазі росту штаму IMB Ac-5017 на невуглеводневих субстратах (етанол, відпрацьована олія) супроводжувалося утворенням ПАР, за наявності яких ступінь розкладання нафти підвищувався на 8−13 % порівняно з використанням препаратів ПАР, синтезованих у середовищі без катіонів міді.* ***Висновки.*** *Наведені дані засвідчують можливість регуляції властивостей ПАР в процесі культивування продуцента. Визначення механізмів, що лежать в основі такої регуляції, дають змогу розробити технології одержання мікробних ПАР, що забезпечують синтез цільового продукту з необхідними, наперед заданими властивостями залежно від сфери практичного застосування.*

Ключові слова: Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, поверхнево-активні речовини, антимікробна та антиадгезивна активність, ключові ферменти, деструкція нафти

© Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Н.М. Петренко, О.І. Палійчук, Г.О. Іутинська, 2018

З кожним роком збільшується кількість публікацій про поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження, які завдяки унікальним фізико-хімічним і біологічним властивостям є продуктами мультифункціонального призначення [1−3], з'являються відомості про нові потенційні сфери їх застосування [4, 5]. Мікробні ПАР є вторинними метаболітами, які синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, склад і співвідношення яких може змінюватися залежно від умов культивування продуцента [6], що в свою чергу спричинятиме і зміну властивостей цільового продукту. У наших попередніх роботах [7, 8] ми акцентували увагу на тому, що на теперішній час дослідження впливу умов культивування на властивості мікробних ПАР залишаються поза увагою дослідників. Є поодинокі роботи, в яких наводяться дані щодо впливу природи джерела вуглецю у середовищі на антимікробну активність синтезованих аміноліпідів [9] і софоролiпідів [10]. Більше публікацій присвячено взаємозв'язку хімічного складу ПАР та їх біологічної активності [11−13], проте у роботах [9−13] лише констатується факт певної залежності без пояснення потенційних її механізмів, не наводиться інформація щодо впливу умов культивування на хімічний склад утворених сполук і тим більше не обговорюється можливість регуляції властивостей ПАР у процесі вирощування мікроорганізмів.

У роботах [7, 8] ми показали, що виявлення потенційних активаторів і/або інгібіторів ключових ферментів біосинтезу компонентів комплексу мікробних ПАР, відповідальних за певні властивості, з наступною відповідною модифікацією складу поживного середовища дає змогу регулювати склад комплексу, а отже, й властивості цільового продукту. Так, у *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [7] і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [8] ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність ПАР, є $НАДФ^+$-залежна глутаматдегідрогеназа, активаторами якої виявилися катіони кальцію і магнію. Збільшення концентрації сульфату магнію до 0,2 г/л або внесення $CaCl_2$ (0,1 г/л) у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося підвищенням цієї ферментативної активності у 2,4 і 3 рази відповідно і посиленням антимікробної і антиадгезивної активності синтезованих ПАР [7]. У разі підвищення з 0,1 до 0,4 г/л вмісту хлориду кальцію у середовищі вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 спостерігали збільшення $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності у 1,5 рази, а також посилення антимікробної і антиадгезивної активності ПАР.

Попередні дослідження [14] показали, що штам *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 синтезує комплекс гліко-, аміно-, фосфо- та нейтральних ліпідів з антимікробною активністю. ПАР штаму IMB Ac-5017 інтенсифікують також процеси розкладання нафти у воді та грунті. Проте раніше ми не вивчали вплив умов культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на властивості синтезованих поверхнево-активних речовин і не досліджували можливість їх регуляції.

Мета даної роботи − визначити умови культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, що забезпечують синтез поверхнево-активних речовин з високою антимікробною та антиадгезивною активностями, а також високою ефективністю деструкції нафтових забруднень.

Матеріали і методи. Основним об'єктом досліджень був виділений нами з забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [6]. Штам ЕК-1 зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ Ас-5017.

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, *Proteus vulgaris* ПА-12; дріжджі *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* ЕІ-8 і мікроміцети *Aspergillus niger* Р-3 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

R. erythropolis ІМВ Ас-5017 вирощували у рідкому середовищі (г/л): $NaNO_3$ – 1,3, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,001, pH 6,8–7,0 (**базове середовище**). В одному з варіантів у середовище додатково вносили $CaCl_2$ в концентрації 0,1 г/л (**модифіковане середовище**). Як субстрат використовували етанол, гексадекан і відпрацьовану (пересмажену) соняшникову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка).

В деяких варіантах в експоненційній фазі росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у середовище вносили Cu^{2+} (0,1 мМ) у вигляді 1М розчину $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

Як інокулят використовували культури в експоненційній фазі росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 0,5–1 % (об'ємна частка) субстрату. Кількість посівного матеріалу (10^4–10^5 кл/мл) становила 5–10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28–30 ºС упродовж 120 год.

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

НАД$^+$-залежну (КФ 1.4.1.2), НАД(Ф)$^+$-залежну (КФ 1.4.1.3) і НАДФ$^+$-залежну (КФ 1.4.1.4) глутаматдегідрогеназну активність аналізували за утворенням глутамату під час окиснення НАД і НАДФН при 340 нм [15]. Під час дослідження впливу катіонів на активність глутаматдегідрогенази в реакційну суміш вносили 0,001–0,01 мМ Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} у вигляді розчинів солей $MnSO_4 \cdot H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ і $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, а також 0,01–10 мМ Ca^{2+}, Mg^{2+} і 25–100 мМ Na^+, K^+ у вигляді розчинів солей $CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl і KCl відповідно.

Активність виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [16]. Глутаматдегідрогеназну активність аналізували

при 28–30 °С – температурі, оптимальній для росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Для дослідження біологічних властивостей (антимікробна та антиадгезивна активність, здатність до деструкції біоплівок) використовували поверхнево-активні речовини, екстраговані з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1), як описано у нашій попередній роботі [14].

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 [7].

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 згідно методики, наведеної у нашій попередній роботі [7].

Моделювання забрудненого нафтою і катіонами металів ґрунту і води здійснювали, як описано раніше [14]. Тривалість експерименту становила 20 діб. Кількість нафти визначали ваговим методом після трикратної екстракції гексаном (співвідношення 1:1). Для дослідження впливу ПАР на розкладання нафти використовували препарати у вигляді культуральної рідини.

Всі досліди проводили в 3 повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [14]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0.05$.

Результати. Встановлено, що у штаму IMB Ac-5017 відновлювальне амінування 2-оксоглутарату з утворенням глутамату (донора аміногруп у подальшому біосинтезі аміноліпідів) здійснюється за участі $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогенази (активність 200−300 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка). У безклітинному екстракті не виявлено $НАД(Ф)^+$- і $НАД^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності.

У табл. 1 наведено дані щодо $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності екстракту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 залежно від концентрації одно- та двовалентних катіонів у реакційній суміші.

Встановлено, що за наявності 5 мМ Ca^{2+} активність підвищувалася у 1,5 раза порівняно з такою без катіонів. Катіони магнію, марганцю, цинку, кобальту, а також натрію виявилися інгібіторами $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності.

На наступному етапі визначали $НАДФ^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність екстракту, одержаного з клітин *R. erythropolis* IMB Ac-5017, вирощених на модифікованому середовищі, в яке додатково вносили хлорид кальцію. Показано, що додавання $CaCl_2$ у середовище культивування штаму IMB B-7241 супроводжувалося підвищенням цієї ферментативної

активності майже у 2 рази (до 450–460 нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка).

Дані щодо антимікробної активності ПАР, синтезованих під час вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у базовому та модифікованому середовищі з етанолом, наведено у табл. 2.

Таблиця 1

Вплив катіонів на НАДФ$^+$-залежну глутаматдегідрогеназну активність у безклітинному екстракті *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Катіони	Концентрація в реакційній суміші, мМ	Активність (нмоль·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка)
Без катіонів (контроль)	0	236±11
Ca^{2+}	0,01	Н.в.
	5	353±17
	10	117±5
Mg^{2+}	0,01	Н.в.
	5	118±6
	10	59±3
Mn^{2+}	0,001	59±3
	0,005	236±11
	0,01	118±6
Zn^{2+}	0,001	59±3
	0,005	59±3
	0,01	59±3
Co^{2+}	0,001	59±3
	0,005	59±3
	0,01	59±3
Na^+	25	174±8
	50	174±8
	100	194±9
K^+	25	209±10
	50	236±11
	100	236±11

Примітки: Ферментативну активність визначали у клітинах бактерій, вирощених на базовому середовищі з етанолом до середини експоненційної фази. Н.в. – не визначали.

Таблиця 2

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017 за різних умов культивування

Тест-культура	МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих на середовищі з етанолом	
	базовому	модифікованому
Bacillus subtilis БТ-2	60	25
Enterobacter cloaceae С-8	240	50
Staphylococcus aureus БМС-1	120	25
Proteus vulgaris ПА-12	120	50
Escherichia coli ІЕМ-1	15	12,5
Candida albicans Д-6	>480	25
Candida utilis ЕІ-8	120	25
Aspergillus niger Р-3	500	100

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

Мінімальні інгібуючі концентрації щодо тест-культур бактерій, дріжджів роду *Candida* і мікроміцетів *Aspergillus niger* Р-3 поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі, в яке додатково вносили хлорид кальцію, були в 1,2−5 разів нижчими, ніж МІК ПАР, синтезованих на базовому середовищі без $CaCl_2$.

У табл. 3 наведено дані щодо адгезії досліджуваних тест-культур на матеріалах, попередньо оброблених розчинами ПАР, синтезованих під час культивування штаму ІМВ Ас-5017 на середовищі з хлоридом кальцію і без Ca^{2+}.

Таблиця 3

Вплив ПАР, синтезованих *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за різних умов культивування, на прикріплення мікроорганізмів до абіотичних поверхонь

Тест-культура	Середовище культивування	Адгезія, %			
		пластик	кахель	сталь	лінолеум
Bacillus subtilis БТ-2	Базове	Н.в.	95	95	82
	Модифіковане	Н.в.	69	71	51
Escherichia coli ІЕМ-1	Базове	70	43	76	96
	Модифіковане	36	20	64	36
Candida albicans Д-6*	Базове	65	36	95	85
	Модифіковане	35	11	47	30
Candida utilis ЕІ-8	Базове	Н.в.	37	46	56
	Модифіковане	Н.в.	15	39	20
Aspergillus niger Р-3*	Базове	Н.в.	70	95	Н.в.
	Модифіковане	Н.в.	45	47	Н.в.

Примітки. Культивування здійснювали на середовищі з етанолом. Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %. Н.в. – не визначали. Концентрація розчинів ПАР – 5 мкг/мл, * – концентрація розчину ПАР 50 мкг/мл.

Додаткове внесення катіонів кальцію у середовище супроводжувалося утворенням ПАР, після обробки якими адгезія клітин бактерій, дріжджів і мікроміцетів на абіотичних поверхнях знижувалася на 12−50 % порівняно з використанням поверхнево-активних речовин, одержаних на базовому середовищі.

Подальші дослідження показали, що й ступінь деструкції біоплівок за наявності ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, синтезованих на модифікованому середовищі, був вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на базовому середовищі без Ca^{2+} (табл. 4).

На наступному етапі досліджували вплив ПАР, синтезованих у процесі культивування штаму ІМВ Ас-5017 на середовищі з етанолом і відпрацьованою олією з додатковим внесенням в експоненційній фазі росту катіонів міді, на розкладання нафти у воді (табл. 5). Встановлено, що ступінь деструкції нафти, а також комплексних з важкими металами нафтових забруднень після обробки препаратами ПАР, одержаних на середовищі з етанолом (відпрацьованою олією) і 0,1 мМ Cu^{2+}, був на 7−11 % вищим порівняно з використанням ПАР, утворюваних на цих субстратах без внесення у середовище культивування катіонів міді (табл. 5).

Таблиця 4

Руйнування біоплівки за наявності ПАР, синтезованих *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на різних середовищах

Тест-культура	Середовище культивування	Руйнування біоплівки (%) після обробки ПАР (мкг/мл)			
		8	16	32	64
Bacillus subtilis БТ-2	Базове	20	34	43	69
	Модифіковане	40	57	67	73
Escherichia coli ІЕМ-1	Базове	46	44	36	28
	Модифіковане	53	50	43	31
Candida albicans Д-6	Базове	49	53	57	59
	Модифіковане	55	63	64	65
Candida utilis ЕІ-8	Базове	45	49	50	54
	Модифіковане	55	57	58	60

Примітки. Культивування здійснювали на середовищі з етанолом. Під час визначення руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Таблиця 5

Деструкція нафти у воді, що містить кілька катіонів токсичних металів, за наявності ПАР, синтезованих у різних умовах культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Ростовий субстрат	Внесення 0,1 мМ Cu^{2+} у середовище	Деструкція нафти (%) у воді за наявності катіонів				
		Без катіонів	Cu^{2+}+ Cd^{2+}+Pb^{2+}	Cu^{2+}+ Cd^{2+}	Cu^{2+}+Pb^{2+}	Cu^{2+}
Етанол	–	50	70	65	63	75
	+	60	81	75	75	85
Відпрацьована олія	–	50	67	65	62	70
	+	57	78	78	73	81

Примітки. Внесення катіонів міді у середовище культивування здійснювали в експоненційній фазі росту штаму IMB Ac-5017. Концентрація нафти у воді – 2,6 г/л. Експозиція – 17 діб. Концентрація кожного з катіонів металів у забрудненій воді – 0,01 мМ. Під час визначення деструкції нафти похибка не перевищувала 5 %.

Схожі результати були одержані під час дослідження деструкції нафтових забруднень у ґрунті за наявності культуральної рідини після вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на гексадекані і відпрацьованій олії з внесенням 0,1 мМ Cu^{2+} в експоненційній фазі росту (табл. 6). Так, ступінь розкладання нафти у ґрунті (без металів) після обробки ПАР, одержаними на гексадекані і відпрацьованій олії, становив 70 і 63 % відповідно, а за наявності препаратів, синтезованих на середовищі з внесенням катіонів міді, підвищувався до 77 і 71 % відповідно. Крім того, за присутності культуральної рідини після вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у цих умовах (з додаванням Cu^{2+}) деструкція комплексних з важкими металами нафтових забруднень у ґрунті досягала 67–99 % (табл. 6). Зазначимо, що ступінь розкладання таких забруднень у разі обробки ґрунту препаратами ПАР, одержаними на гексадекані, був вищим (88–99 %), ніж за наявності ПАР, синтезованих на відпрацьованій олії (67–92 %).

Таблиця 6

Вплив культуральної рідини, одержаної в різних умовах культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, на деструкцію комплексних з важкими металами нафтових забруднень у ґрунті

Джерело вуглецю у середовищі культивування	Суміш металів у ґрунті	Ступінь деструкції нафти (%)
Гексадекан	Без металів	70
Гексадекан (з внесенням 0,1 мМ Cu^{2+})	Без металів	77
	Cu^{2+}+ Cd^{2+}+Pb^{2+}	88
	Cu^{2+}+ Cd^{2+}	95
	Cu^{2+}+Pb^{2+}	99
Відпрацьована олія	Без металів	63
Відпрацьована олія (з внесенням 0,1 мМ Cu^{2+})	Без металів	71
	Cu^{2+}+ Cd^{2+}+Pb^{2+}	67
	Cu^{2+}+ Cd^{2+}	90
	Cu^{2+}+Pb^{2+}	92

Примітки. Концентрація нафти у грунті – 20 г/кг, концентрація Cu^{2+} 0,1 мМ, Cd^{2+} і Pb^{2+} – 0,01 мМ. Експозиція – 20 діб. Під час визначення деструкції нафти похибка не перевищувала 5 %.

Обговорення. Якщо близько 10 років тому у літературі були лише окремі повідомлення про залежність біологічних властивостей мікробних ПАР від їх хімічного складу [10, 17], то останнім часом кількість таких публікацій збільшується [9, 11−13, 18−22]. Зазначимо, що така інформація стосується здебільшого найвідоміших ПАР мікробного походження: рамноліпідів [11, 12, 21, 22−25], софороліпідів [19, 20, 26−28], аміноліпідів бактерій роду *Bacillus* [9, 13, 18, 29, 30].

Разом з тим у роботах [11−13, 18, 21−27, 29, 30] автори не досліджували залежність біологічних властивостей ПАР від умов культивування продуцентів. Однією з причин цього можуть бути висновки, наведені у роботах [31, 32] про неможливість зміною умов культивування досягти біосинтезу аміноліпідів певного складу з наперед заданими властивостями. Це можна зробити тільки в результаті постферментаційної хімічної модифікації синтезованих аміноліпідів [31] або одержанням відповідних генно модифікованих штамів-продуцентів [32]. У зв'язку з цим багато які дослідження останніх років фокусуються саме на таких методах регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР.

Так, у роботі [21] досліджували біологічні властивості (здатність до руйнування біоплівки, антимікробна активність, цитотоксичність) трьох дирамноліпідів, синтезованих *Lysinibacillus* sp. BV152.1, а також їх напівсинтетичних амідних похідних. Встановлено, що хімічна модифікація дирамноліпідів супроводжувалася підвищенням їх антимікробної, антиадгезивної активності та цитотоксичності.

Методи генетичної та метаболічної інженерії використовуються дослідниками для одержання потенційних промислових штамів рамноліпідів [22, 24, 25]. Необхідність проведення таких досліджень зумовлена насамперед тим, що основні продуценти рамноліпідів є штамами патогенних бактерій *Pseudomonas aeruginosa.* У процесі створення генно-інженерних штамів непатогенних представників роду *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida*) і *Burkholderia* було встановлено, що співвідношення моно- і дирамноліпідів у складі синтезованих ПАР можна модифікувати змінен-

ням рівня експресії генів *rhlB* і *rhlC* [22]. Зазначимо, що залежність біологічних властивостей рамноліпідів від співвідношення моно- і дирамноліпідів у їх складі встановлена у роботах [12, 21, 22]. У роботі [25] показано, що гени *rhlA* і *rhlB* незалежно беруть участь у синтезі рамноліпідів, а не у вигляді гетеродимерного комплексу *rhlAB*, як передбачалося раніше.

Tiso із співавт. [24] за допомогою метаболічної інженерії створили штами *P. putida*, які синтезували різні за складом суміші монорамноліпідів, моно- і дирамноліпідів, а також продуценти тільки β-гідроксижирних кислот і гідроксиалканоїлалканоатів. На жаль, у цій роботі не досліджували біологічні властивості цих поверхнево-активних речовин.

Властивості рамноліпідів визначаються не тільки співвідношенням моно- і дирамноліпідів [12, 21, 22], а також і довжиною їх ацильного ланцюга [23]. Штами *P. aeruginosa* синтезують переважно коротколанцюгові рамноліпіди (Rha-Rha-C10-C10), у той час як представники роду *Burkholderia* – довголанцюгові (Rha-Rha-C14-C14). У роботі [23] повідомляється про отримання на основі *Burkholderia glumae* генно-інженерного штаму *P. putida* KT2440, здатного до синтезу довголанцюгових рамноліпідів.

Ще у 2005 р. [33] було встановлено, що фізико-хімічні властивості софоліпідів залежать від співвідношення у складі комплексу лактонної та нелактонної форм цих ПАР, а постферментаційна модифікація можлива лише для софоліпідів з вільним ацильним ланцюгом (нелактонна форма). Пізніше [34] було показано, що етилові ефіри моно- та діацетатпохідних софоліпідів є ефективнішими антибактеріальними агентами, ніж нативні софоліпіди у лактонній формі. У роботі [20] зазначається, що співвідношення лактонної та нелактонної форм софоліпідів, а також ступінь ацилювання і довжина ацильного ланцюга залежать від природи джерела вуглецю у середовищі культивування. У той же час Zhang із співавт. [19] показали, що незалежно від наявності у суміші з глюкозою пальмітинової, стеаринової чи олеїнової кислот синтезовані *Candida bombicola* софоліпіди практично не відрізнялися між собою за антимікробною щодо *Salmonella* spp. і *Listeria* spp. активністю.

Ribeiro із співавт. [26] розробили спосіб виділення з суміші лактонної і нелактонної форм софоліпідів на основі полімерних сорбентів Amberlite XAD16NTM, XAD18TM та XAD1600NTM і показали, що лактонним софоліпідам притаманна вища сперміцидна та протиракова активність.

У роботі [27] повідомляється про виявлення ферменту, відповідального за лактонізацію софоліпідів. Відкриття гена *sble*, що кодує цю лактонестеразу, дало змогу одержати штами *S. bombicola*, здатні до синтезу або лактонної, або нелактонної форм цих гліколіпідів.

В іншій роботі [32] досліджували біологічні властивості аміноліпідів *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. Встановлено, що тільки дві фракції комплексу з шести (бацитрацин Д і фенгіцин) спричиняли антифунгальну дію на *Fusarium oxysporum*. Дослідники отримали генно-інженерні штами SQR9M1і SQR9M2, які синтезували тільки фенгіцин і бацитрацин. Ці результати засвідчують можливість регуляції властивостей мікробних аміноліпідів з використанням генно-інженерних штамів, які синтезують тільки певні складові комплексу ПАР.

Наші результати свідчать про те, що існує значно простіший і не менш ефективний спосіб отримання мікробних ПАР з певними властивостями, а також показують можливість регуляції біологічних властивостей ПАР в процесі культивування продуцента на модифікованому середовищі, що містить активатори ферментів, відповідальних за синтез компонентів комплексу поверхнево-активних речовин з певними необхідними властивостями.

Так, встановлено, що у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність ПАР, є НАДФ$^+$-залежна глутаматдегідрогеназа, активатором якої виявилися катіони кальцію (табл. 1). Зазначимо, що вибір катіонів для дослідження їх впливу на активність цього ферменту зумовлений тим, що згідно з даними літератури, наведеними у наших попередніх статтях [7, 8], вони є інгібіторами або активаторами НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази у різних мікроорганізмів. Подальші дослідження показали, що поверхнево-активні речовини, синтезовані на середовищі, в яке додатково вносили активатори НАДФ$^+$-залежної глутаматдегідрогенази, характеризувалися вищою антимікробною та антиадгезивною активністю і ефективніше руйнували бактеріальні і дріжджові біоплівки, ніж ПАР, одержані на базовому середовищі (табл. 2–4). Ці результати узгоджуються з нашими попередніми даними щодо регуляції біологічних властивостей ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [7] і *N. vaccinii* IMB B-7405 [8].

Раніше [35] нами було встановлено, що додавання Cu^{2+} (0,01–0,05 мМ) в експоненційній фазі росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на гідрофобних (гексадекан, соняшникова олія) і гідрофільних (етанол) субстратах супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР на 25–40% в порівнянні з показниками на середовищі без катіонів міді. Максимальна інтенсифікація синтезу ПАР спостерігалася у разі внесення Cu^{2+} в середовище з вуглеводнями, а підвищення синтезу ПАР за наявності катіонів міді зумовлено їх активуючим впливом на активність алкангідроксилази АлкБ типу (ферменту, що здійснює окиснення вуглеводнів) досліджуваного штаму.

Пізніше [36] було показано, що за наявності невисоких концентрацій Cu^{2+} (0,01–0,05 мМ) і культуральної рідини *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ступінь деструкції нафти у воді та ґрунті через 20 діб був на 15–25% вищим, ніж без катіонів міді. У роботі [36] ми припустили, що інтенсифікація розкладання нафти за присутності катіонів міді може бути зумовлена їх стимулювальним впливом на активність алкангідроксилаз як штамів-продуцентів ПАР, так і природної (автохтонної) нафтоокиснювальної мікробіоти.

Дані попередніх досліджень [35, 36] дали змогу висловити припущення про те, що ефективність розкладання нафти можна підвищити, використовуючи культуральну рідину, одержану після вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 за наявності Cu^{2+}. Подальші експерименти підтвердили це припущення (табл. 5 і 6). Внесення катіонів міді у середовище з невуглеводневими субстратами (етанол, відпрацьована олія) дало змогу попередньо адаптувати мікробні клітини до розкладання нафти завдяки, ймовірно, активуючому впливу Cu^{2+} на алкангідроксилазу штаму-продуцента ПАР.

В останнє десятиліття в літературі з'являється все більше повідомлень про застосування мікробних ПАР в природоохоронних технологіях для видалення як важких токсичних металів, так і комплексних забруднень, що містять різні вуглеводні і метали [37]. У той же час нам не вдалося виявити публікацій, в яких концентрація катіонів важких токсичних металів і момент їх внесення в середовище культивування продуцента розглядалися б як фактори регуляції властивостей мікробних поверхнево-активних речовин.

Отже, на відміну від даних літератури, ми пропонуємо дослідження взаємозв'язку властивостей мікробних ПАР і умов культивування продуцентів з метою розробки технологій одержання препаратів зі стабільними властивостями. Визначення ж механізмів, що лежать в основі такої регуляції, є основою для розробки технологій синтезу мікробних ПАР, які забезпечують синтез цільового продукту з необхідними, наперед заданими властивостями залежно від сфери практичного застосування.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017 НА СВОЙСТВА СИНТЕЗИРОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Пирог Т.П.[1,2], Шевчук Т.А.[2], Петренко Н.Н.[1], Палийчук О.И[1], Иутинская Г.А.[2]

[1]Национальный университет пищевых технологий, ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина
[2]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Цель. Определить условия культивирования *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, обеспечивающие синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) с высокой антимикробной и антиадгезивной активностями, а также высокой эффективностью деструкции нефтяных загрязнений. **Методы.** ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Количество адгезированных клеток и степень разрушения биопленки определяли спектрофотометрическим методом, антимикробные свойства − по показателю минимальной ингибирующей концентрации. Степень деструкции нефти анализировали по остаточной ее концентрации, которую определяли весовым методом после экстракции гексаном. **Результаты**. Установлено, что активатором НАДФ$^+$-зависимой глутаматдегирогеназы (ключевой фермент биосинтеза поверхностно-активных аминолипидов у *R. erythropolis* IMB Ac-5017) являются катионы кальция. Дополнительное внесение $CaCl_2$ (0,1 г/л) в среду культивирования штамма IMB Ac-5017 сопровождалось повышением НАДФ$^+$-зависимой глутаматдегирогеназной активности в 2 раза и синтезом ПАВ, минимальные ингибирующие концентрации которых по отношению к тест-культурам были в 1,2−5 раз ниже, их адгезия на абиотических материалах, обработанных такими ПАВ, на 12−50% ниже, а степень разрушения биопленок в среднем на 9−10% выше по сравнению с показателями, установленными для ПАВ, полученных на базовой среде без Ca^{2+}. Внесение 0,1 мМ Cu^{2+} (активатора

алкангидроксилазы – первого фермента катаболизма н-алканов) в экспоненциальной фазе роста штамма IMB Ac-5017 на неуглеводородных субстратах (этанол, отработанное масло) сопровождалось образованием ПАВ, в присутствии которых степень разложения нефти повышалась на 8−13% по сравнению с использованием препаратов, синтезированных в среде без катионов меди. **Выводы**. Приведенные данные свидетельствуют о возможности регуляции свойств ПАВ в процессе культивирования продуцента. Определение механизмов, лежащих в основе такой регуляции, позволяет разработать технологии получения микробных ПАВ, обеспечивающие синтез целевого продукта с необходимыми, заранее заданными свойствами в зависимости от сферы практического применения.

Ключевые слова: Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, поверхностно-активные вещества, антимикробная и антиадгезивная активность, ключевые ферменты, деструкция нефти.

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV Ac-5017 ON THE PROPERTIES OF SYNTHESIZED SURFACTANTS

Pirog T.P. [1,2]***, Shevchuk T.A.*** [2]***, Petrenko N.M.*** [1]***,***
Paliichuk O.I. [1]***, Iutynska G.O.*** [2]

[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. To establish cultivation conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, which provide the synthesis of surfactants with high antimicrobial and antiadhesive activity, as well as high efficiency of oil pollution destruction. **Methods.** Surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by mixture of chloroform and methanol (2:1). The number of attached cells and the degree of biofilm destruction were analyzed spectrophotometrically. Antimicrobial properties of the surfactants were determined by index of the minimum inhibitory concentration. The degree of oil destruction was analyzed by its residual concentration, which was determined by the weight method after extraction with hexane. **Results.** It has been established that cations of calcium are the activator of $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase (key enzyme of biosynthesis of surface-active aminolipids in *R. erythropolis* IMV Ac-5017). The addition of $CaCl_2$ (0.1 g/l) into cultivation medium of IMV Ac-5017 strain was accompanied by increasing $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity in 2 time and by synthesis of surfactants, the minimum inhibitory concentrations of which with respect to the test cultures were 1,2−5 times lower, their adhesion on abiotic materials treated with such surfactants was 12−50% lower, and the degree of biofilms destruction was on average 9−10% higher as compared to indicators for the surfactant produced in the base medium. The introduction of 0.1 mM Cu^{2+} (activator of alkane hydroxylase - first enzyme of n-alkanes catabolism) in exponential growth phase of IMV Ac-5017 strain on non-hydrocarbon substrates (ethanol, waste oil) was accompanied by formation of surfactants, in the presence of which degree

of oil decomposition increased by 8−13% compared with using preparations synthesized in a medium without copper cations. **Conclusions.** The data presented indicate the possibility of regulating properties of surfactants under producer cultivation. The determining mechanisms underlying this regulation allows development of technologies for production of microbial surfactants, providing synthesis of final product with the necessary predetermined properties, depending on sphere of practical application.

Keywords: Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017, surfactants, antimicrobial and antiadhesive activity, key enzymes, oil degradation.

1. Mnif I, Ghribi D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. Biopolymers. 2015; 104(3): 129−47. doi: 10.1002/bip.22630.
2. Paulino BN, Pessôa MG, Mano MC, Molina G, Neri-Numa IA, Pastore GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100 (24): 10265−93. doi: 10.1007/s00253-016-7980-z.
3. Irorere VU, Tripathi L, Marchant R, McClean S, Banat IM. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. Appl Microbiol Biotechnol. 2017; 101(10): 3941−51. doi: 10.1007/s00253-017-8262-0.
4. Fracchia L, Banat JJ, Cavallo M, Ceresa C, Banat IM. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. AIMS Bioengineering, 2015; 2(3): 144−62. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.144
5. Franco Marcelino PR, da Silva VL, Rodrigues Philippini R, Von Zuben CJ, Contiero J, Dos Santos JC, da Silva SS. Biosurfactants produced by *Scheffersomyces stipitis* cultured in sugarcane bagasse hydrolysate as new green larvicides for the control of Aedes aegypti, a vector of neglected tropical diseases. PLoS One. 2017; 12(11): e0187125. doi: 10.1371/journal.pone.0187125.
6. Pidhorskyy V, Iutinska G, Pirog T. [Intensification of microbial synthesis technologies]. K.: Nauk. Dumka, 2010. 327 p. Ukrainian.
7. Pirog TP, Sidor IV, Lutsai DA. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. Biotechnologia Acta. 2016; 9(6): 50−7. https://doi.org/ 10.15407/biotech9.06.050.
8. Pirog TP, Nikituk LV, Shevchuk TA. [Influence of divalent cations on synthesis of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants with high antimicrobial and anti-adhesion activity]. Mikrobiol Z. 2017; 79(5): 13–22. doi: https://doi.org/10.15407/microbiolj79.05.013. Ukrainian.
9. 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.
10. Shah V, Badia D, Ratsep P. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(1): 397−400. doi: 10.1128/AAC.01118-06.
11. Das P, Yang XP, Ma LZ. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. Front Microbiol. 2014; 5: 696. doi: 10.3389/fmicb.2014.00696.

12. De Rienzo MA, Martin PJ. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. Curr Microbiol. 2016; 73(2): 183−9. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4.
13. Kim K, Lee Y, Ha A, Kim JI, Park AR, Yu NH, Son H, Choi GJ, Park HW, Lee CW, Lee T, Lee YW, Kim JC. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12. Front Plant Sci. 2017; 8: 2010. doi: 10.3389/fpls.2017.02010.
14. Pirog T, Sofilkanych A, Konon A, Shevchuk T, Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. Food Bioprod Process. 2013; 91(2): 149−157. http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001.
15. Smith EL, Austen BM, Blumenthal KM, Nyc JF. Glutamate dehydrogenases. In: Boyer PD, editor. The Enzymes, 3rd ed., vol. 11. New York: Academic Press; 1975. p. 293−367.
16. 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.
17. 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.
18. Kim YG, Kang HK, Kwon KD, Seo CH, Lee HB, Park Y. Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. J Agric Food Chem. 2015; 63(48): 10380−7. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04068.
19. Zhang X, Ashby R, Solaiman DK, Uknalis J, Fan X. Inactivation of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. by palmitic, stearic, and oleic acid sophorolipids and thiamine dilauryl sulfate. Front Microbiol. 2016; 7: 2076. doi: 10.3389/fmicb.2016.02076.
20. Borsanyiova M, Patil A, Mukherji R, Prabhune A, Bopegamage S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. Folia Microbiol (Praha). 2016; 61(1): 85−9. doi: 10.1007/s12223-015-0413-z.
21. Aleksic I, Petkovic M, Jovanovic M, Milivojevic D, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J, Senerovic L. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. Front Microbiol. 2017; 8: 2454. doi: 10.3389/fmicb.2017.02454.
22. Chong H, Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. Microb Cell Fact. 2017; 16(1): 137. doi: 10.1186/s12934-017-0753-2.
23. Wittgens A, Santiago-Schuebel B, Henkel M, Tiso T, Blank LM,Hausmann R, Hofmann D, Wilhelm S, Jaeger KE, Rosenau F. Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida* − a step forward to tailor-made rhamnolipids. Appl Microbiol Biotechnol. 2017. doi: 10.1007/s00253-017-8702-x.
24. Tiso T, Zauter R, Tulke H, Leuchtle B, Li WJ, Behrens B, Wittgens A, Rosenau F, Hayen H, Blank LM. Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. Microb Cell Fact. 2017; 16(1): 225. doi: 10.1186/s12934-017-0838-y.

25. Wittgens A, Kovacic F, Müller MM, Gerlitzki M, Santiago-Schübel B, Hofmann D, Tiso T, Blank LM, Henkel M, Hausmann R, Syldatk C, Wilhelm S, Rosenau F. Novel insights into biosynthesis and uptake of rhamnolipids and their precursors. Appl Microbiol Biotechnol. 2017; 101(7): 2865−78. doi: 10.1007/s00253-016-8041-3.
26. Ribeiro IA, Bronze MR, F Castro M, Ribeiro MH. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. Bioprocess Biosyst Eng. 2016; 39(12): 1825−37. doi: 10.1007/s00449-016-1657-y.
27. Roelants SL, Ciesielska K, De Maeseneire SL, Moens H, Everaert B, Verweire S, Denon Q, Vanlerberghe B, Van Bogaert IN, Van der Meeren P, Devreese B, Soetaert W. Towards the industrialization of new biosurfactants: Biotechnological opportunities for the lactone esterase gene from *Starmerella bombicola*. Biotechnol Bioeng. 2016; 113(3): 550−9. doi: 10.1002/bit.25815.
28. Maddikeri GL, Gogate PR, Pandit AB. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. Chem Eng J. 2015; 263: 479−87, DOI 10.1016/j.cej.2014.11.010.
29. Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2017; 101(15): 5951−60. doi:10.1007/s00253-017-8396-0.
30. Ramachandran R, Shrivastava M, Narayanan NN, Thakur RL, Chakrabarti A, Roy U. Evaluation of antifungal efficacy of three new cyclic lipopeptides of the class bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. Antimicrob Agents Chemother. 2018; 62: e01457-17; doi:10.1128/AAC.01457-17.
31. Mandal SM, Barbosa AE, Franco OL. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. Biotechnol Adv. 2013; 31(5): 338−45. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.
32. Zhihui X, Jiahui S, Bing L, Xin Y, Qirong S, Ruifu Z. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(3): 808−15. doi: 10.1128/AEM.02645-12.
33. Ashby RD, Nuñez A, Solaiman DKY, Foglia TA. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. JAOCS. 2005; 82(9): 625−30.
34. Sleiman JN, Kohlhoff SA, Roblin PM, Wallner S, Gross R, Hammerschlag MR, Zenilman ME, Bluth MH. Sophorolipids as antibacterial agents. Ann Clin Lab Sci. 2009; 39(1): 60−3.
35. Pirog TP, Konon AD, Sofylkanych AP, Shevchuk TA, Parfenyuk SA. [Effect of Cu^{2+} on synthesis of biosurfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017]. Mikrobiol Zh. 2012; 75(1): 3–13. Russian.
36. Pirog TP, Konon AD, Sofilkanich AP, Shevchuk TA, Iutinska GO. [Destruction of oil in the presence of Cu^{2+} and surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405]. Mikrobiol Zh. 2015; 77(2): 2–8. Russian.
37. Ławniczak Ł, Marecik R, Chrzanowski Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(6): 2327–39. doi: 10.1007/s00253-013-4740-1.

Отримано 19.01.2018