

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНИХ ІНДУКТОРІВ НА АНТИМІКРОБНУ, АНТИАДГЕЗИВНУ АКТИВНІСТЬ ТА ДЕСТРУКЦІЮ БІОПЛІВКИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ *NOCARDIA VACCINIИ* ІМВ В-7405

Т.П. Пирог^{1,2}, О.І. Скроцька¹, Т.А. Шевчук²

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

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

Одним з ефективних підходів до підвищення антимікробної активності вторинних метаболітів є спільне культивування продуцента з конкурентними мікроорганізмами. **Мета.** Дослідити антимікробну, антиадгезивну активність, вплив на деструкцію біоплівки поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vacciniИ* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності у середовищі з промисловими відходами клітин *Escherichia coli* ІЕМ-1 і *Bacillus subtilis* БТ-2. **Методи.** Культивування *N. vacciniИ* ІМВ В-7405 здійснювали у середовищі з рафінованою та відпрацьованою соняшниковою олією і відходами виробництва біодизелю. Живі та інактивовані автоклавуванням клітини *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 вносили у середовище на початку процесу або в експоненційній фазі росту. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Антимікробну активність ПАР визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації, вплив розчинів ПАР на адгезію бактеріальних тест-культур до полістиролу і деструкцію біоплівок – спектрофотометричним методом. **Результати.** Встановлено, що незалежно від моменту внесення у середовище культивування продуцента ПАР конкурентних бактерій та їх фізіологічного стану спостерігали синтез поверхнево-активних речовин, антимікробна активність яких щодо широкого спектру бактеріальних тест-культур була у 2–16 разів вищою, ступінь адгезії тест-культур на полістиролі на 16–23 % нижчою, а ступінь руйнування біоплівок на 10–35 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, утвореними на середовищі без конкурентних мікроорганізмів. **Висновки.** Внесення у середовище з відходами виробництва біодизелю та відпрацьованої олії живих та інактивованих клітин бактерій-індукторів, зокрема *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2, дозволяє регулювати не тільки антимікробну, а й антиадгезивну активність ПАР *N. vacciniИ* ІМВ В-7405 та їх здатність до руйнування біоплівок.

Ключові слова: мікробні поверхнево-активні речовини, біологічна активність, конкурентні мікроорганізми.

З року в рік збільшується кількість публікацій з ключовими словами «co-cultivation» і «co-culture» [1–6], в яких мова йде про культивування продуцентів антимікробних метаболітів з іншими мікроорганізмами, які в різних роботах називаються конкурентними або біологічними індукторами. Результатом такого «комбінованого» («змішаного») культивування є підвищення синтезу та/або активності антимікробних сполук [1–3, 5], розширення спектру [1, 4] або навіть утворення нових метаболітів [1, 3, 4, 6], які не синтезувалися монокультурою.

Найбільша кількість таких публікацій присвячена утворенню бактеріоцинів молочно-кислими бактеріями [2, 7, 8], що й зрозуміло, оскільки вплив конкурентних мікроорганізмів на продукцію цих антимікробних пептидів досліджується з 90-х років ХХ ст. [9] і саме ці дослідження стали поштовхом для вивчення індукції синтезу інших метаболітів – антибіотиків, алкалоїдів, терпеноїдів з антимікробною, протипухлинною та цитотоксичною активністю [10, 11]. У той же час інформація про можливість регуляції синтезу або антимікробної ак-

тивності поверхнево-активних речовин (ПАР) мікробного походження до теперішнього часу залишається обмеженою [12, 13].

У попередніх дослідженнях [14] нами було показано, що внесення у середовище культивування продуцента ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 клітин *Escherichia coli* ІЕМ-1 і *Bacillus subtilis* БТ-2 супроводжувалося синтезом поверхнево-активних речовин з підвищеною антимікробною активністю не тільки щодо бактерій-індукторів, а й інших бактеріальних і дріжджових тест-культур. У роботі як субстрат для вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 використовували очищений гліцерин. Зазначимо, що раніше [15, 16] ми встановили можливість синтезу ПАР під час культивування штаму ІМВ В-7405 на промислових відходах: відпрацьованій соняшниковій олії і відходах виробництва біодизелю. Крім того, антимікробна активність ПАР, синтезованих на олієвмісних субстратах залежала від якості пересмаженої олії [17]. Так, у разі використання олії після смаження м'яса спостерігали синтез поверхнево-активних речовин, антимікробна активність яких була нижчою порівняно з ПАР, одержаних на олії після смаження картоплі. На нашу думку, підвищити антимікробну активність таких ПАР можна у разі спільного культивування продуцента з конкурентними мікроорганізмами на відпрацьованій олії, хоча наявність у складі промислових відходів токсичних сполук може негативно впливати на такі біологічні індуктори.

Зазначимо, що мікробні ПАР характеризуються не тільки антимікробною, а й антиадгезивною активністю, у тому числі й здатністю до руйнування біоплівки [18]. Разом з тим, у літературі наявні відомості про вплив конкурентних мікроорганізмів лише на антимікробну активність мікробних ПАР.

У зв'язку з викладеним вище, мета даної роботи – дослідити антимікробну, антиадгезивну активності та вплив на деструкцію біоплівки ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності у середовищі з промисловими відходами клітин *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень. Основним об'єктом досліджень був виділений нами із забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 [19]. Штам К-8 зареєстрований у

Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної Академії наук України за номером ІМВ В-7405. За хімічною природою позаклітинні ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є комплексом гліко-, аміно- і нейтральних ліпідів. Гліколіпіди представлені трегалозоміколатами [15].

Як індуктори використовували бактерії *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Bacillus subtilis* БТ-2. Як тест-культури під час визначення антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, а також їх ролі у руйнуванні біоплівки використовували штами бактерій (*E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Enterobacter cloacae* С-8) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Умови культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405. Штам-продуцент ПАР вирощували у рідкому середовищі (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка). Як джерело вуглецю (2%, об'ємна частка) використовували відходи виробництва біодизелю (біопаливний завод, Полтавська область), рафіновану соняшникову олію (ТМ «Олейна»), відпрацьовану після смаження м'яса соняшникову олію (з мережі «McDonald's», м. Київ).

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену у середовищі наведеного складу з 0,5% відповідного джерела вуглецевого живлення. Інокулянт, в якому чисельність бактерій становила 10^4 – 10^5 кл/мл вносили у кількості 10 % від об'єму середовища.

Бактерії *Escherichia coli* ІЕМ-1 або *Bacillus subtilis* БТ-2, вирощені на м'ясо-пептонному агарі (МПА) упродовж 14 год, титром 10^5 – 10^6 кл/мл суспендували в 100 мл стерильної водопровідної води і вносили 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР у лаг- або експоненційній фазі росту. Інактивовані клітини (стерилізація в автоклаві при 131°C впродовж 1 год) вносили з розрахунку 10 мл суспензії на 100 мл поживного середовища.

Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за наявності *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 і без бактерій-індукторів здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C впродовж 5 діб.

Визначення концентрації поверхнево-активних речовин і одержання препаратів ПАР. Кількість позаклітинних ПАР визначали після їх екстракції сумішшю хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини, як описано у роботі [15]. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g впродовж 20 хв.

У дослідженнях як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин різної концентрації. Для цього сухий залишок ПАР розчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і далі розводили цим буфером до необхідної концентрації. Розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112° С впродовж 30 хв.

Дослідження антимікробної активності ПАР. Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), як описано раніше [14, 17]. Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

Визначення антиадгезивної активності ПАР. Антиадгезивну активність ПАР визначали спектрофотометричним методом, як описано у наших попередніх дослідженнях [19].

Кількість адгезованих клітин визначали як відношення оптичної густини суспензії, отриманої після обробки полістиролу розчинами ПАР, до оптичної густини суспензії, отриманої після обробки поверхні фосфатним буфером (контроль) і виражали у відсотках.

Дослідження ступеня деструкції біоплівки за дії ПАР. Визначення впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали як описано у нашій роботі [20]. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали спектрофотометричним методом як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшету.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експе-

риментальних даних здійснювали, як описано раніше [15, 16]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати досліджень. У табл. 1 наведено мінімальні інгібуючі концентрації щодо бактеріальних тест-культур поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності *E. coli* ІЕМ-1. Ці дані свідчать про те, що при культивуванні штаму ІМВ В-7405 як з живими, так і з інактивованими клітинами конкурентного мікроорганізму спостерігається синтез ПАР, антимікробна активність яких щодо широкого кола грампозитивних і грамнегативних бактерій (у тому числі й до індуктора) була у 3–16 разів вищою, ніж поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі без *E. coli* ІЕМ-1. У цих дослідженнях клітини індуктора вносили у середовище на початку процесу культивування (у лаг-фазі). Наступні експерименти показали, що у разі внесення живих і інактивованих клітин *E. coli* ІЕМ-1 в кінці експоненційної фази росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 як на відходах виробництва біодизелю, так і на олієвмісних субстратах антимікробна активність синтезованих ПАР була практично такою самою, як і за внесення індуктора на початку процесу культивування. Оскільки з технологічної точки зору простішим є внесення конкурентних мікроорганізмів у лаг-фазі, у подальших дослідженнях їх вносили на початку процесу культивування продуцента ПАР.

Дані, наведені у табл. 2, свідчать про те, що за наявності у середовищі з усіма субстратами живих і інактивованих клітин *B. subtilis* ВТ-2 спостерігали утворення ПАР, антимікробна активність яких щодо тест-культур була у 2–8 разів вищою порівняно з показниками, встановленими для поверхнево-активних речовин, синтезованих за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 без індуктора.

Адгезія клітин бактеріальних тест-культур на полістиролі після обробки ПАР, синтезованими за наявності інактивованих клітин конкурентних мікроорганізмів, була у середньому на 16–23 % нижчою, ніж у разі використання для обробки цієї поверхні поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі без *E. coli* ІЕМ-1 або *B. subtilis* ВТ-2 (табл. 3). Аналогічні результати були одержані у разі використання як індукторів живих клітин бактерій.

Таблиця 1

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vacsinii* ІМВ В-7405 за наявності у середовищі культивування *Escherichia coli* ІЕМ-1 та без індуктора

Субстрат	Стан клітин індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо					
		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Відходи виробництва біодизелю	Живі	5	10	5	20	20	10
	Інактивовані	6	12	12	24	12	6
	Без індуктора	80	160	40	160	80	80
Рафінована соняшникова олія	Живі	8	16	8	32	16	16
	Інактивовані	10	20	10	20	10	10
	Без індуктора	50	100	50	100	100	50
Відрацьована соняшникова олія	Живі	12	24	24	96	48	24
	Інактивовані	10	20	20	80	40	20
	Без індуктора	70	140	70	280	140	140

Примітка: При визначенні мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %. Індуктор вносили у середовище на початку процесу культивування (у лаг-фазі).

Таблиця 2

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardia vacsinii* ІМВ В-7405 за наявності у середовищі культивування *Bacillus subtilis* БТ-2 та без індуктора

Субстрат	Стан клітин індуктора	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо					
		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Відходи виробництва біодизелю	Живі	7	14	7	28	28	14
	Інактивовані	8	16	16	32	16	8
	Без індуктора	40	80	40	160	80	40
Рафінована соняшникова олія	Живі	6	12	6	24	12	12
	Інактивовані	7	28	14	28	14	14
	Без індуктора	20	80	40	160	80	80
Відрацьована соняшникова олія	Живі	10	20	20	80	40	20
	Інактивовані	20	40	20	80	40	20
	Без індуктора	40	120	80	320	160	160

Примітка: При визначенні мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %. Індуктор вносили у середовище на початку процесу культивування (у лаг-фазі).

Таблиця 3

Антиадгезивна активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності та відсутності інактивованих клітин біологічних індукторів

Субстрат	Індуктор	Адгезія (%)			
		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2
Відходи виробництва біодизелю	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	35	39	31	25
	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	32	36	28	27
	Без індуктора	50	54	48	43
Рафінована соняшникова олія	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	50	38	35	47
	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	49	38	31	45
	Без індуктора	67	59	55	68
Відпрацьована соняшникова олія	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	50	54	43	47
	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	50	54	43	47
	Без індуктора	69	70	63	69

Примітка: При визначенні адгезії похибка не перевищувала 5 %. Концентрація ПАР – 40 мкг/мл. Індуктор вносили у середовище на початку процесу культивування (у лаг-фазі).

Подальші експерименти показали, що ПАР, синтезовані за наявності у середовищі культивування *E. coli* ІЕМ-1 або *B. subtilis* БТ-2, ефективніше руйнували біоплівки бактеріальних тест-культур порівняно з препаратами, утвореними під час вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 без індукторів – ступінь деструкції біоплівок становив 73–93 і 50–72 % відповідно (табл. 4).

Обговорення. Перше питання, що потребує обговорення – це вибір конкурентних мікроорганізмів (біологічних індукторів) для регуляції активності антимікробних метаболітів. У роботах [6, 10, 11] зазначається, що у природних умовах мікроорганізми зазвичай існують у вигляді мікробних спільнот, в яких для пригнічення конкурентів у боротьбі за поживні речовини деякі з них синтезують антимікробні сполуки. Тому як біологічні індуктори доцільно обирати мікроорганізми з одних і тих самих природних місць існування.

Так, спільне культивування *Streptomyces rochei* МВ037, ізольованих з морської губки, та виділених з м'яких коралів *Rhinocladia similis* 35 супроводжувалося утворенням п'яти антимікробних метаболітів, два з яких не синтезувалися монокультурою *S. rochei* МВ037 [6]. Культивування *Penicillium fuscum* і *Penicillium*

camembertii/clavigerum, виділених з одного й того самого зразка води, супроводжувалося утворенням восьми нових 16-членних макролідів берkeleyлактонів А–Н і макролідного антибіотика А26771В, не характерних для монокультур [21].

У той же час у роботі [5] як конкурентні мікроорганізми для морської актинобактерії *Streptomyces* sp. РТУ08712 використовували патогени людини – *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Результатом кокультивування було підвищення синтезу трьох антибіотиків – гранатіцину, гранатоміцину Д і дигідрогранатіцину В, а також кількох їхніх аналогів.

У разі спільного культивування *Aspergillus versicolor* 8.1.3а, що був виділений з морської губки, з лабораторним штамом *B. subtilis* 168 trpC2 спостерігали синтез більш як 30 вторинних метаболітів, серед яких чотири нових (циклічний пентапептид, афлахінолон і два антрахінони), не характерних для монокультури гриба [22]. Інші дослідники [1] використали *B. subtilis* 168 trpC2 для сумісного культивування з ендоефітним грибом *Fusarium tricinctum* (номер штаму не наведено), в результаті якого спостерігали синтез дев'яти антимікробних сполук, серед яких чотири виявилися новими.

Таблиця 4

Інтенсивність деструкції бактеріальних біоплівки під впливом ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності та відсутності біологічних індукторів

Субстрат	Клітини індукторів	Деструкція, %			
		<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>B. subtilis</i> БТ-2	<i>Pseudomonas</i> sp. МП-2	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1
Олія рафінована	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 живі	83	88	78	68
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 інактивовані	82	86	79	70
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 живі	90	91	82	74
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 інактивовані	93	90	85	73
	Контроль (без індуктора)	72	57	68	54
Олія відпрацьована	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 живі	87	89	н.в.	68
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 інактивовані	88	87	79	74
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 живі	89	93	89	82
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 інактивовані	80	90	82	77
	Контроль (без індуктора)	64	70	59	60
Відходи виробництва біодизелю	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 живі	87	91	78	75
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1 інактивовані	89	87	80	77
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 живі	90	89	83	79
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 інактивовані	87	85	85	81
	Контроль (без індуктора)	68	64	50	53

Примітка: Концентрація ПАР –100 мкг/мл. н.в. – не визначали. Під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %. Індуктор вносили у середовище на початку процесу культивування (у лаг-фазі).

У роботах [7, 8] як конкурентні мікроорганізми для продуцентів бактеріоцинів *Lactobacillus paracasei* HD1-7 і *B. subtilis* NK16 використовували штами *B. subtilis* і *E. coli*. Зазначимо, що автори цих робіт, як і праць [1, 5, 22], не пояснювали вибір біологічних індукторів для спільного культивування з продуцентами вторинних метаболітів.

Вибір штамів *B. subtilis* і *E. coli* як індукторів у наших дослідженнях зумовлений тим, що у більшості робіт їх використання виявилось ефективним як для підвищення синтезу антимікробних метаболітів, так і їх активності.

Друге питання – це фізіологічний стан клітин індуктора. В огляді [2] зазначається, що для індукції синтезу бактеріоцинів молочнокислими бактеріями найчастіше використовують живі клітини конкурентних мікроорганізмів, рідше – термічно інактивовані або автоклавовані і дуже рідко – супернатант після вирощування мікроорганізмів-індукторів. Живі клітини конкурентних мікроорганізмів найчастіше вносять у середовище культивування продуцентів не тільки бактеріоцинів, а й інших антимікробних

вторинних метаболітів [4–6]. Зазначимо, що більшість дослідників для підвищення синтезу та/або активності антимікробних сполук використовують або тільки живі клітини індуктора, або тільки інактивовані. Роботи, в яких досліджується вплив на активність антимікробних метаболітів індукторів різного фізіологічного стану (живі та інактивовані) є нечисельними [8, 23–25].

Зазначимо, що у працях [24, 25] автори не виявили позитивного впливу на антимікробну активність цільового продукту супернатантів, одержаних після вирощування мікроорганізмів-індукторів (на відміну від живих [25] чи живих і інактивованих [24] клітин). Такі результати можуть свідчити про те, що індукуючий фактор асоційований з клітинами. Дійсно, у роботі [2] зазначається, що для індукції синтезу бактеріоцинів необхідно є міжклітинна взаємодія, а одним з основних механізмів індукції є синтез кворум-сигнальних молекул: ацильованих гомосерин-лактонів у грамнегативних бактерій, невеликих пептидів (у грампозитивних), а також так званих аутоіндукторів-2. Ці сигнальні

молекули беруть участь у регуляції певних специфічних генів.

Benitez із співавт. [24] встановили, що підвищення антимікробної активності пептидів *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 спостерігалось за наявності у середовищі культивування як живих, так і термічно інактивованих клітин *E. coli* ATCC 25922. Наші дослідження показали, що біологічна активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 збільшувалася у разі внесення у середовище культивування як живих, так і інактивованих клітин бактерій-індукторів.

Отже, незважаючи на певні успіхи у розшифруванні механізмів індукції синтезу метаболітів за наявності конкурентних мікроорганізмів, на теперішній час залишається багато питань, які потребують подальших детальних досліджень.

Третє питання – вибір тест-культур для визначення антимікробної активності метаболітів, синтезованих за наявності мікроорганізмів-індукторів. У роботах [6, 12, 22, 24–26] дослідники використовували як тест-культури патогенні чи умовно патогенні бактерії, відмінні від індукторів. У той же час у дослідженнях [5] індукторами і тест-культурами для аналізу антимікробної активності були одні й ті самі патогенні бактерії.

Наші дослідження (табл. 1 і 2) свідчать про те, що ПАР, синтезовані за наявності у середовищі культивування продуцента штамів *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2, характеризувалися високою антимікробною активністю не тільки щодо цих індукторів, а й інших бактерій – *P. vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *S. aureus* БМС-1, *E. cloacae* С-8.

Четверте питання – біологічна активність синтезованих метаболітів (антимікробна, цитотоксична, протипухлинна чи кілька активностей одночасно). Аналіз даних літератури показав, що у переважній більшості робіт [1, 5, 6, 8, 12, 21–25, 27] дослідники визначали тільки антимікробну активність метаболітів, синтезованих у разі спільного культивування продуцента з конкурентними мікроорганізмами. У деяких роботах [10, 28–30] повідомляється про протипухлинну та цитотоксичну активність сполук, утворених за наявності біологічних індукторів.

Результати наших досліджень показали, що у разі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за наявності *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2 утворювалися поверхнево-активні речовини, які

характеризувалися вищою антимікробною і антиадгезивною активністю, а також здатністю до руйнування біоплівки порівняно з ПАР, синтезованими монокультурою.

П'яте питання – публікації про вплив біологічних індукторів на синтез та/або властивості мікробних ПАР. У нашій попередній роботі, опублікованій у 2017 р. [14], ми проаналізували наявну на той час відповідну інформацію.

Упродовж останніх двох років у літературі з'явилося кілька публікацій, присвячених підвищенню синтезу ПАР [13, 31] та їх біологічної активності [12, 31] під впливом біологічних індукторів. Спільне культивування продуцентів ПАР *Pseudomonas* sp. 374 і *Bacillus licheniformis* з біоплівкоутворюючими штамми *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *Listeria innocua* NCTC 11288 супроводжувалося підвищенням рівня синтезу ПАР у 3–20 разів [13]. У разі внесення у середовище культивування *B. amyloliquefaciens* Р11 інактивованих тепловою обробкою клітин *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923 або *A. parasiticus* синтезувалися ПАР, антимікробна активність яких щодо *L. monocytogenes* ATCC 7644 підвищувалася у 3–3,5 рази. У літературі нам вдалося знайти лише одне повідомлення [31] про вплив конкурентного мікроорганізму (*Vibrio harveyi* МТСС 7771) на синтез ПАР *Staphylococcus lentus* SZ2, які виявились ефективними деструкторами біоплівки індуктора: ступінь руйнування збільшився на 40 % у порівнянні з гліколіпідами, синтезованими монокультурою *S. lentus* SZ2.

У попередній роботі [14] ми припустили, що підвищення антимікробної активності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих за наявності бактерій-індукторів, може бути зумовлене зміною співвідношення певних компонентів у складі комплексу поверхнево-активних речовин, зокрема підвищенням вмісту ліпопептидів, відповідальних за антимікробну активність. З'ясуванню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Отже, одержані результати свідчать про можливість регуляції не тільки антимікробної, а й антиадгезивної активності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 та їх здатності до руйнування біоплівки внесенням у середовище з відходами виробництва біодизелю та відпрацьованої олії живих та інактивованих клітин конкурентних бактерій, зокрема *E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2.

INFLUENCE OF BIOLOGICAL INDUCERS ON ANTIMICROBIAL, ANTIADHESIVE ACTIVITY AND BIOFILM DESTRUCTION BY *NOCARDIA VACCINII* IMV V-7405 SURFACTANTS

T.P. Pirog^{1,2}, O.I. Skrotska¹, T.A. Shevchuk²

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

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

Summary

One of the effective approaches to increasing antimicrobial activity of secondary metabolites is the co-cultivation of the producer with competitive microorganisms. **Aim.** To study the antimicrobial, anti-adhesive activity, effect on the destruction of biofilms of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized in the presence of *Escherichia coli* IEM-1 and *Bacillus subtilis* BT-2 cells in a medium with industrial waste. **Methods.** Cultivation of *N. vaccinii* IMV B-7405 was carried out in a medium with refined and fried sunflower oil, as well as waste of biodiesel production. Live and inactivated by autoclaving *E. coli* IEM-1 and *B. subtilis* BT-2 cells were introduced into the medium at the beginning of the process and

in the exponential growth phase. Surfactants were extracted from the supernatant of the culture liquid with a mixture of chloroform and methanol (2:1). The antimicrobial activity of surfactants was determined by the minimum inhibitory concentration, the effect of surfactant solutions on the adhesion of bacterial test cultures to polystyrene and the destruction of biofilms – by spectrophotometric method. **Results.** It was found that regardless of the moment of introducing competitive bacteria into the medium of producer cultivation and their physiological state, synthesis of surfactants was observed which antimicrobial activity against wide range of bacterial test cultures was 2–16 times higher, adhesion degree on polystyrene – 16–23% lower, and the degree of biofilms destruction – 10–35% higher compared with the parameters established for surfactants obtained on medium without competitive microorganisms. **Conclusions.** The introduction of live and inactivated bacterial inducer cells, in particular, *E. coli* IEM-1 and *B. subtilis* BT-2, into the medium with waste of biodiesel production and fried oil, allows to regulate not only antimicrobial, but also anti-adhesive activity of *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactants and their ability to destroy biofilms.

Keywords: microbial surfactants, biological activity, competitive microorganisms.

1. Ola AR, Thomy D, Lai D, Brotz-Oesterhelt H, Proksch P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. J Nat Prod. 2013; 76 (11):2094–9. doi: 10.1021/np400589h.
2. Chanos P, Mygind T. Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100(10):4297–308. doi: 10.1007/s00253-016-7486-8.
3. Ueda K, Beppu T. Antibiotics in microbial coculture. J Antibiot (Tokyo). 2017; 70(4):361–5. doi: 10.1038/ja.2016.127.
4. Wakefield J, Hassan HM, Jaspars M, Ebel R, Rateb ME. Dual induction of new microbial secondary metabolites by fungal bacterial co-cultivation. Front Microbiol. 2017; 8:1284. doi:10.3389/fmicb.2017.01284.
5. Sung AA, Gromek SM, Balunas MJ. Upregulation and identification of antibiotic activity of a marine-derived *Streptomyces* sp. via co-cultures with human pathogens. Mar Drugs. 2017; 15(8):250. doi:10.3390/md15080250/
6. Yu M, Li Y, Banakar SP, Liu L, Shao C, Li Z, et al. New metabolites from the co-culture of marine-derived actinomycete *Streptomyces rochei* MB037 and fungus *Rhinochadiella similis* 35. Front Microbiol. 2019; 10:915. doi:10.3389/fmicb.2019.00915.
7. Ge J, Fang B, Wang Y, Song G. *Bacillus subtilis* enhances production of Paracin1.7, a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HD1-7, isolated from Chinese fermented cabbage. Ann Microbiol. 2014, 4:1735–43. doi 10.1007/s13213-014-0817-z.

8. Abd FN, Jaber K, Luti K. Improvement of bacteriocin production by *Bacillus subtilis* NK16 via elicitation with prokaryotic and eukaryotic microbial cells. *Iraqi J Biotechnol.* 2016; 15 (2):59–73. <http://jige.uobaghdad.edu.iq/index.php/IJB/article/view/186>.
9. Barefoot SF, Chen YR, Hughes TA, Bodine AB, Shearer MY, Hughes MD. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(10):3522–3528.
10. Marmann A, Aly AH, Lin W, Wang B, Proksch P. Co-cultivation – a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar Drugs.* 2014; 12(2):1043–1065. doi: 10.3390/md12021043.
11. Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender JL. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnol Adv.* 2014; 32(6):1180–1204. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.
12. Leães FL, Velho RV, Caldas DG, Ritter AC, Tsai SM, Brandelli A. Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. *Res Microbiol.* 2016; 167(2):83–89. doi: 10.1016/j.resmic.2015.10.005.
13. Alves AR, Sequeira AM, Cunha Â. Increase in bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2019; 69(1):79–86. doi: 10.1111/lam.13169.
14. Pirog TP, Nikituk LV, Makienko VO, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Regulation of antimicrobial activity of surfactants, synthesized by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(3):27–35. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj79.03.027>.
15. 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):149–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001>.
16. 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 product. *Food Bioprod Proces.* 2015; 93(1):11–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>.
17. Pirog TP, Nikituk LV, Antonuk SI, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Peculiarities of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesis on waste oil of different quality and their antimicrobial properties]. *Mikrobiol Z.* 2017; 79(2):13–22. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj79.02.013>.
18. Chen J, Wu Q, Hua Y, Chen J, Zhang H, Wang H. Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101(23–24):8309–19. doi:10.1007/s00253-017-8554-4.
19. Pirog TP, Konon AD, Beregovaya KA, Shulyakova MA. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405. *Microbiology.* 2014; 83(6):732–39. <https://doi.org/10.1134/S0026261714060150>.
20. Pirog TP, Kliuchka IV, Kliuchka LV, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Biofilm destruction in the presence of surfactants synthesized under different cultivation conditions of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405]. *Mikrobiol. Z.* 2019; 81(5):3–15. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj81.05.003>.
21. Stierle AA, Stierle DB, Decato D, Priestley ND, Alverson JB, Hoody J, et al. The berkeleylactones, antibiotic macrolides from fungal co-culture. *J Nat Prod.* 2017; 80(4):1150–1160. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00133.
22. Abdel-Wahab NM, Scharf S, Özkaya FC, Kurtán T, Mándi A, Fouad MA, et al. Induction of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* through Co-cultivation with *Bacillus subtilis*. *Planta Med.* 2019; 85(6):503–512. doi:10.1055/a-0835-2332.

23. Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena T. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2009; 132 (2–3):109–116. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.004.
24. Benitez L, Correa A, Daroit D, Brandelli A. Antimicrobial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 is enhanced in the presence of *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 2011; 62(3):1017–1022. doi: 10.1007/s00284-010-9814-z.
25. Man LL, Meng XC, Zhao RH. Induction of plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *Food Control.* 2012; 23(2):462–469. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.08.015.
26. Somkuti GA, Steinberg DH. Pediocin production in milk by *Pediococcus acidilactici* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010; 37(1):65–69. doi:10.1007/s10295-009-0648-2.
27. Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Martín V, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM. Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiol.* 2016;16:37. doi:10.1186/s12866-016-0663-1.
28. Soliman SS, Raizada MN. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of taxol from an endophytic fungus in host taxus plants. *Front Microbiol.* 2013; 4:3. doi:10.3389/fmicb.2013.00003.
29. Vinale F, Nicoletti R, Borrelli F, Mangoni A, Parisi OA, Marra R, et al. Co-culture of plant beneficial microbes as source of bioactive metabolites. *Sci Rep.* 2017; 7(1):14330. doi:10.1038/s41598-017-14569-5.
30. Bao J, Wang J, Zhang XY, Nong XH, Qi SH. New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum*. *Chem Biodivers.* 2017;14(3):10.1002/cbdv.201600327. doi:10.1002/cbdv.201600327.
31. Hamza F, Kumar AR, Zinjarde S. Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: Role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*. *Enzyme Microb Technol.* 2018; 114:33–39. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.03.008.

Отримано 8.01.2020