

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 SURFACTANTS

I.V. Savenko, D.V. Andreyko
National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241, microbial surfactants, biofilm, antimicrobial properties, minimum inhibitory concentration

Article history:

Received 10.04.2015
Received in revised form 6.06.2015
Accepted 9.06.2015

Corresponding author:

Inga_92@ukr.net
avm103@rambler.ru

ABSTRACT

The dependence of antimicrobial properties of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surface-active agents (surfactants, SAS) on the nature of the carbon source in the cultivation medium (ethanol, glycerol, n-hexadecane), and the presence of a yeast autolysate and certain microelements was established. Exception of yeast autolysate and microelements mixtures from the medium with all substrates accompanied by decreasing antimicrobial properties of SAS synthesized by strain IMV B-7241. The minimum inhibitory concentration (MIC) of surfactants synthesized on ethanol in presence of yeast autolysate and microelements against bacteria (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* IEM-1) and yeast (*Candida albicans* Д-6) was lower and was 9–20 ($\mu\text{g/ml}$) than MIC of SAS, obtained on glycerol (9–68 $\mu\text{g/ml}$) and n-hexadecane (27–54 $\mu\text{g/ml}$)

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241

I.V. Савенко, аспірант
Д.В. Андрейко, студент
Національний університет харчових технологій

Експериментально встановлено залежність антимікробних властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 від природи джерела вуглецю в середовищі культивування (етанол, гліцерин, n-гексадекан) та від наявності в ньому дріжджового автолізу та певних мікроелементів. За умов росту штаму IMV B-7241 на всіх досліджуваних субстратах виключення зі складу поживного середовища дріжджового автолізу та суміші мікроелементів супроводжувалося зниженням антимікробних властивостей синтезованих ПАР. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) поверхнево-активних речовин, синтезованих на етанолі за присутності дріжджового автолізу та мікроелементів щодо бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* IEM-1) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6) була нижчою і становила 9–20 мкг/мл, порівняно з МІК ПАР, синтезованих на гліцерині (9–68 мкг/мл) та n-гексадекані (27–54 мкг/мл).

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, мікробні поверхнево-активні речовини, біоплівка, антимікробні властивості, мінімальна інгібуюча концентрація.

Вступ. Найбільш небезпечним явищем в харчовій промисловості є колонізація мікроорганізмами технологічного обладнання, що спричиняє не лише псування сировини, а й можливість отруєння мікробними токсинами споживачів готової продукції. Більшість мікроорганізмів здатні утворювати біоплівки, в складі яких є резистентними до існуючих біоцидів, що і зумовило пошук альтернативних антимікробних сполук [1]. З літератури [2] відомо, що такими препаратами можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР). Оскільки мікробні ПАР є безпечними для людини та навколишнього середовища, вони можуть знайти потенційне використання у харчовій промисловості, агропромисловому секторі та медицині.

Поверхнево-активні речовини мікробного походження є вторинними метаболітами і, як правило, синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук (аміно-, гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів) [3]. У різних умовах культивування продуцентів співвідношення компонентів комплексу вторинних метаболітів може змінюватися, що супроводжується зміною їх біологічних властивостей [4]. Проте дані про вплив умов культивування на властивості мікробних ПАР досить обмежені і стосуються винятково антимікробної дії поверхнево-активних речовин. Так, в роботі [5] зазначено, що при культивуванні *Bacillus amylofaciens* AR2 на декстрозі, сахарозі або гліцерині синтезується суміш ліпопептидів (сурфактин, ітурин, фенгіцин), у той час як на мальтозі, лактозі і сорбітолі продукується тільки ітурин. Максимальні антифунгальні властивості щодо мікроміцетів родів *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria* проявляли ПАР, синтезовані на сахарозі і декстрозі [5].

Відомо лише поодинокі праці, присвячені дослідженням взаємозв'язку хімічного складу мікробних поверхнево-активних речовин та їх біологічних властивостей [5—7]. Однак у цих працях автори не вивчали зміну складу і властивостей ПАР в залежності від умов культивування продуцентів.

У попередніх дослідженнях [8] було показано залежність синтезу поверхнево-активних речовин від наявності у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 факторів росту і певних мікроелементів, а також природи джерела вуглецевого живлення (етанол, гліцерин, *n*-гексадекан). Заміна дріжджового автолізату і суміші мікроелементів у складі етанол — і *n*-гексадеканвмісних середовищ на сульфат міді і сульфат заліза, а у середовищі з гліцерином — на хлорид калію, сульфат цинку і сульфат міді супроводжувалася підвищенням синтезу ПАР, проте зниженням їх антиадгезивних властивостей. Такі дані засвідчують вплив умов культивування на біологічні властивості цільового продукту.

Раніше [9] було встановлено, що поверхнево-активним речовинам, синтезованим *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі, притаманні антимікробні властивості, у тому числі й щодо фітопатогенних бактерій.

Мета даної роботи — дослідити антимікробну дію поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 залежно від наявності факторів росту і мікроелементів у складі етанол, *n*-гексадекан- і гліцеринвмісних середовищ.

Матеріали та методи. Продуцент ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 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 містив (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 [8].

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол, *n*-гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка), гліцерин — 1 % (об'ємна частка).

В одному з варіантів у середовище з етанолом і *n*-гексадеканом замість дріжджового автолізату і розчину мікроелементів вносили Cu^{2+} (0,16 мкмоль/л) і Fe^{2+} (3,6 мкмоль/л), а в середовище з гліцерином — Zn^{2+} (38 мкмоль/л), Cu^{2+} (0,16 мкмоль/л) і K^+ у концентрації 0,21 моль/л як описано у праці [8]. 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 сапернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) як описано раніше [9].

Як тест-культури під час визначення антимікробних властивостей ПАР використовували бактерії (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1) і дріжджі (*Candida albicans* Д-6) з

колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення мінімальної інгібуючої концентрації здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів як описано у роботі [10]. Результати оцінювали візуально по помутнінню середовища: (+) — пробірки, де спостерігалось помутніння середовища, (—) — помутніння було відсутнє. МІК розчину ПАР визначали як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній, і в першій, де він був наявний.

Результати та обговорення. У табл. 1 і 2 наведено мінімальні інгібуючі концентрації щодо тест-культур поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на етанолі.

Таблиця 1. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації ПАР, синтезованих за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на етанолі за наявності дріжджового автолізату і мікроелементів

№ п/п	Розведення	ПАР, мкг/мл	Ріст тест-культури			
			<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>C. albicans</i> Д-6
1	1:1	850	—	—	—	—
2	1:2	430	—	—	—	—
3	1:4	210	—	—	—	—
4	1:8	100	—	—	—	—
5	1:16	50	—	—	—	—
6	1:32	25	—	—	—	—
7	1:64	12	—	—	+	—
8	1:128	6	+	+	+	+
9	1:256	3	+	+	+	+
МІК			9	9	20	9

Примітки: табл. 1—5: під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %; табл. 1 і 2: «—» ріст відсутній, «+» ріст наявний

Таблиця 2. Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, синтезованих на етанолі за додавання CuSO_4 і FeSO_4

№ п/п	Розведення	ПАР, мкг/мл	Ріст тест-культури			
			<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>C. albicans</i> Д-6
1	1:1	1400	—	—	—	—
2	1:2	700	—	—	—	—
3	1:4	350	—	—	—	—
4	1:8	180	—	—	—	—
5	1:16	90	—	—	—	—
6	1:32	45	—	—	+	—
7	1:64	23	—	—	+	+
8	1:128	12	+	+	+	+
9	1:256	6	+	+	+	+
10	1:512	3	+	+	+	+
МІК			18	18	70	34

Дані свідчать, що виключення із складу середовища для культивування продуцента дріжджового автолізату і суміші мікроелементів та заміна їх на сульфат міді і сульфат заліза супроводжувалися зниженням у 2,0—3,8 разів антимікробних властивостей ПАР штаму IMB В-7241.

Аналогічні закономірності спостерігали при дослідженні антимікробних властивостей ПАР, синтезованих за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на *n*-гексадекані (табл. 3). Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі із сульфатами міді та заліза, була вищою в 1,3—2,6 разів (МІК 36—71 мкг/мл) порівняно з показником, встановленим для ПАР, синтезованих за наявності факторів росту.

Наступні дослідження показали, що заміна дріжджового автолізату і розчину мікроелементів на хлорид калію і сульфати міді та цинку в гліцеринвмісному середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 також супроводжувалася значним зниженням антимікробної дії синтезованих ПАР (табл. 4).

Таблиця 3. Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на *n*-гексадекані

Групи мікро-організмів	Назва мікроорганізмів	МІК (мкг/мл) за присутності ПАР, синтезованих за наявності у середовищі	
		дріжджового автолізату, мікроелементів	CuSO ₄ , FeSO ₄
Бактерії	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	27	71
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	27	71
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	27	36
Дріжджі	<i>C. albicans</i> Д-6	54	71

Таблиця 4. Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР штаму IMB B-7241, синтезованих на гліцерині

Групи мікро-організмів	Назва мікроорганізмів	МІК (мкг/мл) за присутності ПАР, синтезованих за наявності у середовищі	
		дріжджового автолізату, мікроелементів	CuSO ₄ , ZnSO ₄ , KCl
Бактерії	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	9	38
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	34	75
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	34	75
Дріжджі	<i>C. albicans</i> Д-6	68	75

Зазначимо, що ефективність антимікробних властивостей ПАР залежала не тільки від наявності в середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 факторів росту і певних мікроелементів, а й від природи джерела вуглецевого живлення (табл. 5). Так, найефективнішими антимікробними агентами виявилися поверхнево-активні речовини, синтезовані на етанолі за наявності дріжджового автолізату і мікроелементів (МІК 9—20 мкг/мл), у той час як ПАР, отримані в аналогічних умовах культивування на гліцерині і *n*-гексадекані, інгібували ріст досліджуваних бактерій та дріжджів у вищих (9—68 і 27—54 мкг/мл відповідно) концентраціях.

Таблиця 5. Вплив джерела вуглецю на антимікробні властивості розчину ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Тест-культура	МІК (мкг/мл) за присутності ПАР, синтезованих на		
	етанолі	<i>n</i> -гексадекані	гліцерині
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	9	27	9
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	9	27	34
<i>E. coli</i> ІЕМ-1	20	27	34
<i>C. albicans</i> Д-6	9	54	68

Примітка. Середовище для культивування містило дріжджовий автолізат і мікроелементи.

Встановлені в даній роботі антимікробні властивості ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є значно вищими, ніж визначені для відомих з літератури мікробних поверхнево-активних речовин [2, 11—13]. Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 щодо бактерій родів *Escherichia* та *Bacillus* (9—75 мкг/мл) є значно нижчими, ніж МІК гліколіпідів *Pseudomonas aeruginosa* MR01 та *Pseudomonas aeruginosa* MASH1 (128 та 512 мкг/мл) [2], поверхнево-активних речовин *B. subtilis* LB5a (1050 мкг/мл) [11], а також рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* RT32 (122 мкг/мл) та софороліпідів *Candida bombicola* D17 (320 мкг/мл) [12, 13].

Висновки. Таким чином, результати даної роботи свідчать про можливість використання низьких (9—75 мкг/мл) концентрацій поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 як ефективних антимікробних агентів. Встановлено залежність антимікробної дії ПАР штаму IMB B-7405 від умов культивування продуцента. Доведено необхідність проведення таких досліджень для подальшого одержання ефективних антимікробних препаратів, адже не завж-

ди підвищення синтезу поверхнево-активних речовин супроводжується утворенням цільового продукту з необхідними біологічними властивостями. Припускаємо, що зміна антимікробних властивостей пояснюється різним співвідношенням гліко-, аміно- і нейтральних ліпідів у складі ПАР, синтезованих в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.

ЛІТЕРАТУРА

1. Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance / R. Vasudevan // J. Microbiol. Exp. — 2014. — Vol. 1, N 3. — doi: 10.15406/jmen.2014.01.0014.
2. Lotfabad B. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains / B. Lotfabad, F. Shahcheraghi, F. Shooraj // Jundishapur J. Microbiol. — 2013. — Vol. 6, N 1. — doi: 10.5812/jjm.2662.
3. Marchant R. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants / R. Marchant, M. Banat // Biotechnol. Lett. — 2012. — Vol. 34, N 9. — doi: 10.1007/s10529-012-0956-x.
4. Подгорский В.С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В.С. Подгорский, Г.О. Иутинская, Т.П. Пирог // Киев: Наук. думка. — 2010. — 327 с.
5. Singh, A. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2 / A. Singh, R. Rautela, S. Cameotra // Microb. Cell Fact. — 2014. — Vol. 13. — doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
6. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/*amyloliquefaciens* / H. Cawoy [et al.] // Microb. Biotechnol. — 2015. — Vol. 8, N 2. — doi: 10.1111/1751-7915.12238.
7. Mannosylerythritol lipids: production and applications / T. Morita [et al.] // J. Oleo. Sci. — 2015. — Vol. 64, N 2. — doi: 10.5650/jos.ess14185.
8. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 / Т.П. Пирог [и др.] // Микробиол. журнал. — 2013. — Т. 75, № 5. — С. 19—27.
9. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV В-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vacinii* K-8 on phytopathogenic bacteria / T.P. Pirog [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. — 2013. — Vol. 49, № 4. — P. 360—367.
10. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents / P. Mazzola [et al.] // Braz. J. Pharm. Sci. — 2009. — Vol. 45, N 2. — doi: org/10.1590/S1984-82502009002008.
11. Pereira de Quadros C. Biological activities of a mixture of biosurfactant from *Bacillus subtilis* and alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* / C. Pereira de Quadros, M. Duarte, G. Pastore // Braz. J. Microbiol. — 2011. — Vol. 42, N 1. — P. 354—361.
12. Das P. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity / P. Das, X. Yang, L. Ma // Front. Microbiol. — 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00696.
13. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactants produced by *Candida species* / R. Rufino [et al.] // Curr. Microbiol. — 2012. — Vol. 24, N 8. — doi: 10.5772/ 52578.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241

И.В. Савенко, Д.В. Андрейко

Национальный университет пищевых технологий

Экспериментально установлена зависимость антимикробных свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 от природы источника

углерода в среде культивирования (этанол, глицерин, *n*-гексадекан) и от наличия в нем дрожжевого автолизата и определенных микроэлементов. При культивировании штамма ИМВ В-7241 на всех исследуемых субстратах исключение из состава питательной среды дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов сопровождалось снижением антимикробных свойств синтезированных ПАВ. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) поверхностно-активных веществ, синтезированных на этаноле в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов по отношению к бактериям (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* IEM-1) и дрожжей (*Candida albicans* Д-6) была ниже и составляла 9–20 мкг/мл, по сравнению с МИК ПАР, синтезированных на глицерине (9–68 мкг/мл) и *n*-гексадекане (27–54 мкг/мл).

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, микробные поверхностно-активные вещества, биопленка, антимикробные свойства, минимальная ингибирующая концентрация.