УДК 579.663

THE STRATEGY OF OBTAINING MICROBIAL SURFACTANTS WITH STABLE PRESET PROPERTIES

T. Pirog, L. Nikitiuk, O. Paliichuk, D. Lutsai
National University of Food Technologies

Key words:
Surfactants
Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017
Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241
Nocardia vaccinii IMV B-7405
Regulation of antimicrobial and anti-adhesive activity

Article history:
Received 04.03.2019
Received in revised form 22.03.2019
Accepted 12.04.2019

Corresponding author:
T. Pirog
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

Microbial surfactants are secondary metabolites that are synthesized in the form of complex of similar compounds, the composition and ratio of which depending on the cultivation conditions of the producer what is accompanied by changing the properties of final product. However, the current study of effects of cultivation conditions on the properties of microbial surfactants remains without attention of researchers. Literary data testify that to achieve the biosynthesis of surfactant of certain composition with predetermined properties it is possible only as a result of post-fermentation chemical modification or obtaining of the corresponding genetically-modified producer strains.

Basing on studing approaches to control regulation properties of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants the strategy of obtaining microbial surfactants with stable preset properties was developed. This strategy consist of such elements:

- identification in surfactants complex of the components responsible for certain properties and the search for factors that provide a predominant synthesis of such components;
- to study changes of surfactants properties during producer cultivation and to determine growth phase in which the synthesis of surfactants possessing necessary properties occurs;
- studing interrelation between surfactants properties and their protective functions and to determine cultivation conditions necessary for development of EPS protective functions;
- co-cultivation of surfactants producers with competitive microorganisms, in response to the presence of which increases the antimicrobial and anti-adhesive activity of synthesized final product.

DOI: 10.24263/2225-2924-2019-25-2-5

СТРАТЕГІЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗІ СТАБІЛЬНИМИ ЗАДАНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Т.П. Пирог, Л.В. Никитюк, О.І. Палійчук, Д.А. Луцай
Національний університет харчових технологій

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є вторинними метаболітами, які синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, склад і співвідношення

яких змінюється залежно від умов культивування продуцента, що в свою чергу спричиняє і зміну властивостей цільового продукту. Проте на теперішній час дослідження впливу умов культивування на властивості мікробних ПАР залишаються поза увагою дослідників. Літературні дані засвідчують, що досягти біосинтезу ПАР певного складу з наперед заданими властивостями можна тільки в результаті постферментаційної хімічної модифікації або одержанням відповідних генно-модифікованих штамів-продуцентів.

На основі досліджень контрольованої регуляції властивостей поверхнево-активних речовин Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, Nocardia vaccinii IMB B-7405 пропонується стратегія розробки технології біосинтезу мікробних ПАР зі стабільними заданими властивостями, яка складається з таких елементів:

- виявлення у складі комплексу ПАР компонентів, відповідальних за певні властивості та пошук факторів, які забезпечують переважний синтез таких складових;

- дослідження зміни властивостей ПАР в процесі культивування продуцента і визначенні фази росту, в якій відбувається синтез цільового продукту з необхідними властивостями;

- дослідження взаємозв'язку між властивостями ПАР та їх захисними функціями і визначення умов культивування продуцента, необхідних для прояву захисних функцій;

- спільне культивування продуцентів ПАР з конкурентними мікроорганізмами, у відповідь на наявність яких підвищується антимікробна та антиадгезивна активність синтезованого цільового продукту.

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, Nocardia vaccinii IMB B-7405, регуляція антимікробної та антиадгезивної активності.*

Постановка проблеми. Біодеградательні та нетоксичні мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) мультифункціонального призначення завдяки поверхнево-активним, емульгувальним властивостям, антимікробній та антиадгезивній активності є гідною альтернативою хімічним ПАР для використання у різних галузях промисловості, медицині, а також у природоохоронних технологіях [1—5].

Проте нині промисловий випуск ПАР мікробного походження обмежений лише невеликою кількістю фірм-виробників [6], хоча виробництво синтетичних ПАР у світі становить 15 млн т/рік, а до 2020 р. очікується збільшення їх обсягу до 24 млн т [7]. Така ситуація зумовлена недостатньо високою ефективністю мікробних технологій одержання поверхнево-активних речовин, однією з причин якої є високі витрати на процес біосинтезу, а також невисока концентрація синтезованих ПАР. Одним з підходів до зниження собівартості мікробних ПАР є використання як субстратів промислових відходів, зокрема відпрацьованої олії [8—10].

Іншим недоліком мікробних ПАР є можливість змінення їхніх властивостей залежно від умов культивування продуцента, оскільки вони є вторинними

метаболітами і синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, про що йшла мова у наших попередніх дослідженнях [11; 12]. У цих працях ми акцентували увагу на тому, що на теперішній час дослідження впливу умов культивування на властивості мікробних ПАР залишаються поза увагою дослідників. Разом з тим останніми роками збільшується кількість публікацій про залежність біологічних властивостей мікробних ПАР від їх хімічного складу [13—16], проте автори цих праць не досліджували залежність біологічних властивостей ПАР від умов культивування продуцентів і можливість регуляції таких властивостей у процесі біосинтезу.

Крім того, існуючі технології виробництва практично цінних вторинних метаболітів являють собою періодичні процеси, орієнтовані на максимальний вихід цільового продукту. Оскільки в процесі культивування склад синтезованих метаболітів може змінюватися, немає гарантій одержати продукт з потрібними для практичного використання властивостями.

Необхідність отримання мікробних ПАР із заданими властивостями зумовлена тим, що залежно від галузі практичного використання препаратів (природоохоронні технології, сільське господарство, медицина тощо) їх біологічні властивості повинні бути різними. Так, наприклад, для деструкції нафтових забруднень у воді та ґрунті недоцільно застосовувати поверхнево-активні речовини, що характеризуються високою антимікробною активністю. Це зумовлено тим, що основним механізмом підвищення деструкції нафти за наявності ПАР є солюбілізація вуглеводнів нафти і, як наслідок, активація природної нафтоокиснювальної мікробіоти, на яку ті ж самі ПАР можуть спричиняти антимікробну дію. Ефективні антимікробні та антиадгезивні властивості мікробних ПАР можуть бути успішно використані, наприклад, в складі дезінфікуючих і мийних засобів або в рослинництві для контролю чисельності фітопатогенних мікроорганізмів.

У зв'язку з викладеним вище **мета дослідження** — визначення фізіологічних підходів до регуляції властивостей мікробних поверхнево-активних речовин і розробка стратегії одержання таких препаратів стабільного складу з певними властивостями залежно від галузі можливого практичного застосування.

Викладення основних результатів дослідження. Об'єктами дослідження були ізольовані нами з забруднених зразків грунту штами нафтоокиснювальних бактерій [17], депоновані у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України як *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405.

За хімічною природою [18] ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 є комплексом гліко- (трегалозомоно- і диміколати), нейтральних (цетиловий спирт, пальмітинова кислота, метиловий ефір н-пентадеканової кислоти, міколові кислоти), аміно- і фосфоліпідів (фосфатидилгліцерин, фосфатидилетаноламін). У складі ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 виявлені гліко- (трегалозомоно- і диміколати, трегалозомоно- і діацелати) і аміноліпіди. *N. vaccinii* IMB B-7405 синтезує комплекс нейтральних, гліко- і аміноліпідів. Нейтральні ліпіди представлені міколовими і н-алкановими кислотами, гліколіпіди — трегалозодіацелатами і трегалозоміколатами.

Суть *першого* підходу до регуляції властивостей мікробних ПАР полягає *у виявленні в їхньому складі компонентів, відповідальних за певні властивості та пошуку факторів, які забезпечують переважний синтез таких складових комплексу ПАР.*

Згідно з літературними даними [19; 20], аміноліпіди є більш ефективними антимікробними агентами, ніж гліколіпіди, а нейтральні ліпіди характеризуються дуже слабкою антимікробною активністю. Отже, підвищений вміст у складі комплексу ПАР поверхнево-активних аміноліпідів може супроводжуватися посиленням антимікробної активності цільового продукту. Оскільки одним із механізмів антиадгезивної активності мікробних ПАР є їхня антимікробна дія, то препарати з високим вмістом аміноліпідів повинні бути й ефективними антиадгезивними агентами.

Біологічні властивості рамноліпідів визначаються співвідношенням моно- і дирамноліпідів у складі комплексу [21; 22], а також довжиною їх ацильного ланцюга [23]. Ще у 2005 р. [24] було встановлено, що властивості софоролліпідів залежать від співвідношення у складі комплексу лактонної та нелактонної форм цих ПАР.

Згідно з літературними даними [22; 23; 25—31] досягти біосинтезу аміно-, рамно- і софоролліпідів певного складу з наперед заданими властивостями можна тільки тільки в результаті постферментаційної хімічної модифікації або одержанням відповідних генно-модифікованих штамів-продуцентів. У зв'язку з цим дослідження останніх років фокусуються саме на таких методах регуляції біологічних властивостей мікробних ПАР.

Методи генетичної та метаболічної інженерії використовуються дослідниками для одержання потенційних промислових штамів рамноліпідів [22; 23; 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 зміненням рівня експресії генів *rhlB* і *rhlC* [22]. Штами *P. aeruginosa* синтезують переважно коротколанцюгові рамноліпіди (Rha-Rha-C10-C10), у той час як представники роду *Burkholderia* — довголанцюгові (Rha-Rha-C14-C14). У [23] повідомляється про отримання на основі *Burkholderia glumae* генно-інженерного штаму *P. putida* KT2440, здатного до синтезу довголанцюгових рамноліпідів. Tiso із співавт. [25] 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.

У [26] показано, що етилові ефіри моно- та діацетат-похідних софоролліпідів є ефективнішими антибактеріальними агентами, ніж нативні софоролліпіди у лактонній формі. Ribeiro із співавт. [27] розробили спосіб виділення з суміші лактонної і нелактонної форм софоролліпідів на основі полімерних сорбентів Amberlite XAD16NTM, XAD18TM та XAD1600NTM і показали, що лактонним софоролліпідам притаманна вища сперміцидна та протиракова активність. У [28] повідомляється про виявлення ферменту, відповідального

за лактонізацію софороліпідів. Відкриття гену *sble*, що кодує цю лактонестеразу, дало змогу одержати штами *S. bombicola*, здатні до синтезу або лактонної, або нелактонної форм цих гліколіпідів.

Zhihui із співавт. [30] 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.

У [31] 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.

Результати наших досліджень [11; 12; 32] 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 у процесі культивування продуцента на модифікованому середовищі, що містить активатори ферментів, відповідальних за синтез компонентів комплексу поверхнево-активних речовин з певними необхідними властивостями.

У попередніх дослідженнях було встановлено, що ключовим ферментом біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів (найефективніших антимікробних агентів) у *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 є $НАДФ^+$-залежна глутаматдегідрогеназа. У [11; 12; 33] показано, що активаторами цього ферменту в *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є катіони кальцію (5 мМ), магнію (10 мМ) і цинку (0,001—0,01 мМ), у *R. erythropolis* IMB Ac-5017 — катіони кальцію (5 мМ), у *N. vaccinii* IMB B-7405 — катіони кальцію (5 і 10 мМ), натрію (25—100 мМ) і калію (50 і 100 мМ). У разі додаткового внесення активаторів ферменту або збільшення їх вмісту в середовищі культивування досліджуваних штамів спостерігали підвищення активності $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогеназної активності в 1,5—3 рази порівняно з такою на базовому середовищі.

Подальші дослідження показали, що добавлення $CaCl_2$ (0,1 г/л) в середовище культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017, підвищення концентрації цієї солі до 0,4 г/л в середовищі для вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405, а також додавання $CaCl_2$ (0,1 г/л), збільшення вмісту $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ до 0,2 г/л або внесення Zn^{2+} (38 мкМ) в середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 супроводжувалося синтезом ПАР з підвищеною антимікробною та антидгезивною активністю. Так, мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) таких ПАР щодо тест-культуру були в 1,2—13 разів нижчими, їхня адгезія на абіотичних поверхнях, оброблених цими препаратами, — в середньому на 10—40% нижчою, а ступінь руйнування біоплівок — на 7—20% вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, отриманих на базовому середовищі.

Суть *другого* підходу до регуляції властивостей мікробних поверхнево-активних речовин полягає *в дослідженні їхніх змін у процесі культивування продуцента і визначенні фази росту, в якій відбувається синтез ПАР з необхідними властивостями.* Зазначимо, що в літературі відсутні відомості про залежність

антимікробної й антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин мікробного походження від тривалості вирощування біологічних агентів.

Наші ж дослідження показали, що ПАР, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 упродовж 7 діб на рафінованій і відпрацьованій соняшниковій олії, виявилися ефективнішими антимікробними агентами щодо фітопатогенних бактерій, ніж ПАР, утворювані на 5 добу культивування продуцента на цих субстратах [34].

Збільшення з 5 до 7 діб тривалості вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії супроводжувалося синтезом ПАР, МІК яких щодо бактерій *(Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-*1*, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. MI-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3) і дріжджів (*Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6) знижувалися у 1,4—4 рази. Показник мінімальної інгібуючої концентрації ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 корелював з наявністю у складі синтезованих ПАР аміноліпідів і активністю $НАДФ^+$-залежної глутаматдегідрогенази — ключового ферменту їх біосинтезу [35]. Проте у разі збільшення з 5 до 7 діб тривалості вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 як на очищеному, так і технічному гліцерині спостерігали зниження антимікробної й антиадгезивної активності синтезованих ПАР: мінімальні інгібуючі концентрації щодо більшості досліджуваних тест-культур підвищувалися у 1,5—2 рази.

Суть *третього* підходу до регуляції властивостей мікробних поверхнево-активних речовин полягає *в дослідженні взаємозв'язку між властивостями ПАР та їх захисними функціями і визначенні умов культивування продуцента, необхідних для прояву захисних функцій.* На жаль, поза увагою біотехнологів залишаються дослідження, пов'язані з вивченням фізіологічних функцій продуктів мікробного синтезу. З'ясування причин, які зумовлюють необхідність синтезу цих сполук для самого продуцента, дасть змогу з нових позицій підійти до вирішення багатьох проблем біотехнології, в тому числі й одержання метаболітів із заданими властивостями.

Фізіологія мікроорганізмів, яка вивчає зв'язок між їхньою метаболічною активністю і змінами умов навколишнього середовища, повинна відігравати центральну роль при розробці біотехнологій. Так, мікроорганізми-продуценти необхідно розглядати як об'єкти, властивості яких змінюються залежно від умов навколишнього середовища. Жодна сучасна техніка культивування не дасть очікуваних поліпшень процесів без знання основ фізіології продуцентів. Знання біохімії не дадуть інформації, як підвищити швидкість процесів, які засоби лімітування або інгібування застосувати. Мутанти-надсинтетики продуктів метаболізму, отримані новітніми засобами генної інженерії, не будуть довго розвиватися, якщо не знайти оптимальні для них умови, що забезпечують для самої клітини переваги надсинтезу того або іншого метаболіту.

В останнє десятиліття в літературі з'являється все більше повідомлень про застосування мікробних ПАР у природоохоронних технологіях для видалення як важких токсичних металів, так і комплексних забруднень, що містять різні вуглеводні і метали [5—7]. У той же час нам не вдалося виявити публікацій, у яких досліджувався ріст і утворення ПАР за наявності важких металів, а концентрація металу і момент його внесення в середовище культивування

розглядалися б як фактори інтенсифікації синтезу мікробних поверхнево-активних речовин та регуляції їхніх властивостей.

Наші дослідження показали, що додавання Cu^{2+} (0,01—0,5 мМ) в експоненційної фазі росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на гідрофобних (гексадекан, рідкі парафіни, соняшникова олія) і гідрофільних (етанол, гліцерин) субстратах супроводжувалося підвищенням концентрації ПАР на 25—140% порівняно 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) досліджуваних штамів, а також захисними функціями синтезованих ПАР. Так, показано, що виживання клітин штамів-продуцентів ПАР за дії 0,01—0,1 мМ катіонів міді досягало 50—65%, а після видалення поверхнево-активних речовин знижувалося до 0—10%.

Дослідження впливу ПАР, синтезованих штамами IMB B-7241, IMB Ac-5017 і IMB B-7405 на традиційних субстратах і промислових відходах, на розкладання нафти у воді (2,6—6 г/л) та ґрунті (20 г/кг), у тому числі й за наявності важких токсичних металів (0,01—0,5 мМ Cu^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}) показало, що найвищий ступінь деструкції нафтових забруднень (до 95%) спостерігався за наявності культуральної рідини після вирощування штамів на гексадекані та рідких парафінах. Внесення Cu^{2+} (0,1—0,5 мм) в експоненційній фазі росту штамів IMB B-7241 і IMB Ac-5017 на невуглеводневих субстратах (етанол, відпрацьована олія) супроводжувалося утворенням ПАР, після обробки якими забруднених нафтою та важкими металами води і ґрунту ступінь розкладання нафти підвищувався на 8—15% порівняно з використанням препаратів ПАР, синтезованих у середовищі без катіонів міді. Інтенсифікація деструкції нафти за наявності таких ПАР може бути зумовлена активуючим впливом Cu^{2+} на активність алкангідроксилази і, як наслідок, попередньою адаптацією клітин до споживання вуглеводнів нафти. Крім того, поверхнево-активні речовини, потрапляючи у забруднені воду та ґрунт, утворюють комплекси з металами, а також емульгують нафту, у результаті чого відбувається детоксикація катіонів металів і підвищується біодоступність нафти як для клітин продуцентів ПАР, так і для природної нафтоокиснювальної мікробіоти, чисельність якої у воді після обробки ПАР збільшувалась на один-два порядки. Зазначимо, що виживання клітин нафтоокиснювальної мікробіоти води за наявності ПАР і катіонів металів (0,01—0,05 мМ) у суспензії становило 76—95%, тоді як без ПАР — усього 0,1—0,4%, що вказує на захисні властивості цих метаболітів щодо токсичної дії металу. Отже, механізм біоремедіації комплексних забруднень у воді полягає у солюбілізації нафти ПАР, активації катіонами міді алкангідроксилаз як продуцентів ПАР, так і природної нафтоокиснювальної мікробіоти, а також захисних функціях ПАР.

Суть *четвертого* підходу до регуляції антимікробної активності мікробних ПАР полягає *у спільному культивуванні продуцентів ПАР з конкурентними мікроорганізмами.* Передумовою для реалізації цього підходу стали літературні дані щодо інтенсифікації синтезу бактеріоцинів і їхньої антимікробної актив-

ності у відповідь на наявність у середовищі культивування сторонніх бактерій (так званих біологічних індукторів). Залежно від продуцентів бактеріоцину та штамів-індукторів у результаті спільного культивування має місце підвищення активності синтезованих антимікробних сполук [36; 37], збільшення їх концентрації [38; 39] або обидва ефекти спостерігаються одночасно [40].

У літературі [41; 42] є відомості про те, що в багатьох випадках спільне культивування мікроорганізмів приводить до синтезу нових антимікробних сполук, які не утворюються монокультурами.

У [41] встановлено, що наявність *Trichoderma* sp. 307 в середовищі культивування *Acinetobacter johnsonii* B2 індукує синтез штамом B2 як традиційних метаболітів, так і кількох нових сполук, здатних інгібувати ферменти метаболізму вуглеводів. Автори праці [42] проводили як спільне, так і окреме культивування *Actinokineospora* sp. EG49 та *Nocardiopsis* sp. RV163, після чого проводили виділення, ідентифікацію та дослідження властивостей синтезованих вторинних метаболітів. Було встановлено, що спільне вирощування індукувало утворення *Nocardiopsis* sp. RV163 1,6-дихлорфеназину, який спричиняв антимікробну дію на *Bacillus* sp. P25, представників роду *Trypanosoma* та *Actinokineospora* sp. EG49.

Останніми роками у літературі стали з'являтися повідомлення [43; 44] про можливість індукованого синтезу поверхнево-активних речовин за наявності конкурентних мікроорганізмів.

У [43] досліджувалася дія на деякі бактерії антимікробних сполук (у тому числі й ПАР), синтезованих штамом *Exiguobacterium* sp. HKG-126 як у вигляді моно-, так і змішаних культур з патогенними штамами *Arthrobacter* sp. HKG 115, *Bacillus sonorensis* HKG 102, *Micrococcus luteus* та *Staphylococcus aureus*. Показано, що за наявності патогенних мікроорганізмів антимікробна дія синтезованих сполук посилювалася — МІК знижувався у 1,5—2 рази порівняно з ПАР, синтезованими у монокультурі.

У статті [44] описано, що значне підвищення антимікробної дії ПАР *Bacillus amyloliquefaciens* LBM 5006 спостерігали за спільного культивування з *E. coli* ATCC 25922, тоді як додавання клітин *S. aureus* ATCC 25923 та *Bacillus cereus* ATCC 9634 не спричиняло ніякого впливу на властивості синтезованих метаболітів. Внесення інактивованих клітин штаму ATCC 25922 у середовище культивування продуцента ПАР також супроводжувалося підвищенням антимікробної активності поверхнево-активних речовин, у той час як у разі додавання безклітинного екстракту *E. coli* такого ефекту не спостерігали.

Наші експерименти показали, що внесення у середовище вирощування *N. vaccinii* IMB B-7405 як живих, так і інактивованих клітин *E. coli* IEM-1 і *B. subtilis* БТ-2 супроводжувалося синтезом ПАР з підвищеною антимікробною активністю. Так, мінімальні інгібуючі концентрації щодо бактерій і дріжджів поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності *E. coli* IEM-1 *і B. subtilis* БТ-2, становили 6—50 мкг/мл і були в 2,4—13 разів нижчими, ніж МІК ПАР, утворюваних на середовищі без бактерій-індукторів. Ступінь руйнування біоплівок *E. coli* IEM-1, *B. subtilis* БТ-2, *Pseudomonas* sp. MI-2 та *S. aureus* БМС-1 за наявності ПАР, синтезованих під час спільного культи-

вування *N. vaccinii* IMB B-7405 з *E. coli* IEM-1 і *B. subtilis* БТ-2, був на 15—20% вищим порівняно з показниками, встановленими для поверхнево-активних речовин, утворених на середовищі без бактерій-індукторів.

Принциповою відмінністю одержаних нами результатів від описаних у літературі є те, що у відповідь на наявність конкурентних мікроорганізмів у середовищі культивування продуцента ПАР підвищується не синтез цільового продукту (поверхнево-активних речовин), а посилюється їхня антимікробна дія, причому не тільки на бактерії-індуктори, а й інші бактерії та дріжджі. Крім того, встановлено, що внесення в середовище культивування продуцента ПАР сторонніх мікроорганізмів дає змогу підвищити не тільки антимікробну, а й антиадгезивну активність синтезованих поверхнево-активних речовин.

Висновки

Отже, реалізація фізіологічних підходів до регуляції властивостей поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 стала основою для розробки стратегії одержання мікробних ПАР зі стабільними заданими властивостями залежно від галузі їх практичного використання.

Література

1. Fracchia L., Banat J.J., Cavallo M., Ceresa C., Banat I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*. 2015, 2(3): 144—162. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.144

2. Paulino B.N., Pessôa M.G., Mano M.C., Molina G., Neri-Numa I.A., Pastore G.M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100(24): 10265—10293. doi: 10.1007/s00253-016-7980-z.

3. Irorere V.U., Tripathi L., Marchant R., McClean S., Banat I.M. Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101(10): 3941—3951. doi: 10.1007/s00253-017-8262-0.

4. Franco Marcelino P.R., da Silva V.L., Rodrigues Philippini R., Von Zuben C.J., Contiero J., Dos Santos J.C., da Silva S.S. 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.

5. Parthipan P., Preetham E., Machuca L.L., Rahman P.K., Murugan K., Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front. Microbiol.* 2017, 8:193. doi: 10.3389/fmicb.2017.00193. 2017.

6. Sekhon Randhawa K.K., Rahman P.K. Rhamnolipid biosurfactants — past, present, and future scenario of global market. *Front. Microbiol.* 2014, 5:454. doi: 10.3389/fmicb.2014.00454.

7. 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.

8. Ebadipour N., Lotfabad T.B., Yaghmaei S., RoostaAzad R. Optimization of low-cost biosurfactant production from agricultural residues through response surface methodology. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2016, 46(1): 30—38. doi: 10.1080/10826068.2014.979204.

9. Pirog T.P., Shulyakova M.O., Nikituk L.V., Antonuk S.I., Elperin I.V. Industrial waste bioconversion into surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405. *Biotechnologia acta.* 2017, 10(2): 22—33. https://doi.org /10.15407/biotech10.02.022.

10. Almeida D.G., Soares da Silva R.C., Luna J.M., Rufino R.D., Santos V.A., Sarubbo L.A. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Front. Microbiol.* 2017, 8:157. doi: 10.3389/fmicb.2017.00157.

11. Pirog T.P., Sidor I.V., Lutsai D.A. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Biotechnologia acta*. 2016, 9(6): 50—57. https://doi.org/ 10.15407/biotech9.06.050.

12. Pirog T.P., Nikituk L.V., Shevchuk T.A. 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: http://microbiolj.org.ua/en/archiv/2017-tom-79/5-sep-oct-tom-79/2017-79-5-02. Ukrainian.

13. De Rienzo M.A., Martin P.J. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr. Microbiol.* 2016, 73(2): 183—189. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4.

14. Kim K., Lee Y., Ha A., Kim J.I., Park A.R., Yu N.H., Son H., Choi G.J., Park H.W., Lee C.W., Lee T., Lee Y.W., Kim J.C. 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.

15. Tiso T., Zauter R., Tulke H., Leuchtle B., Li W.J., Behrens B., Wittgens A., Rosenau F., Hayen H., Blank L.M. Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microb. Cell Fact.* 2017, 16(1):225. doi: 10.1186/s12934-017-0838-y.

16. Ramachandran R., Shrivastava M., Narayanan N.N., Thakur R.L., 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.

17. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Gregirchak N.N. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005, 41(1): 51—55. https://doi.org/10.1007/s10438-005-0010-z.

18. 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.

19. Cochrane S.A., Vederas J.C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Med. Res. Rev.* 2016, 36(1): 4—31. doi 10.1002/med.21321.

20. Bernat P., Paraszkiewicz K., Siewiera P., Moryl M., Plaza G., Chojniak J. Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 32(10). doi: 10.1007/s11274-016-2126-0.

21. De Rienzo M.A., Martin P.J. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr. Microbiol.* 2016, 73(2): 183—189. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4.

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 L.M., Hausmann R., Hofmann D., Wilhelm S., Jaeger K.E., 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. Ashby R.D., Nuñez A., Solaiman D.K.Y., Foglia T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream. JAOCS. 2005, 82(9): 625—630.

25. Tiso T., Zauter R., Tulke H., Leuchtle B., Li W.J., Behrens B., Wittgens A., Rosenau F., Hayen H., Blank L.M. Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microb. Cell Fact.* 2017; 16(1):225. doi: 10.1186/s12934-017-0838-y.

26. Sleiman J.N., Kohlhoff S.A., Roblin P.M., Wallner S., Gross R., Hammerschlag M.R., Zenilman M.E., Bluth M.H. Sophorolipids as antibacterial agents. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39(1): 60—63.

27. Ribeiro I.A., Bronze M.R., F Castro M., Ribeiro M.H. Selective recovery of acidic and lactonic sophorolipids from culture broths towards the improvement of their therapeutic potential. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2016, 39(12):1825—1837. doi: 10.1007/s00449-016-1657-y.

28. Roelants S.L., Ciesielska K., De Maeseneire S.L., Moens H., Everaert B., Verweire S., Denon Q., Vanlerberghe B., Van Bogaert I.N., 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—559. doi: 10.1002/bit.25815.

29. Mandal S.M., Barbosa A.E., Franco O.L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31(5), 338—345. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004.

30. 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—815. doi: 10.1128/AEM.02645-12.

31. 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.

32. Pirog T.P., Savenko I.V., Shevchuk T.A. Effect of Zn^{2+} on synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants with antimicrobial and antiadhesive properties. *Microbiol. Z.* 2016, 78(4): 49—58. http://microbiolj.org.ua/images/files/magazine/2016/4/-2016_78_4_05_Pirog.pdf. Russian.

33. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Savenko I.V., Lutsai D.A. Influence of cations on $NADP^+$-dependent glutamate dehydrogenase activity in bacteria of genera *Acinetobacter*, *Rhodococcus* and *Nocardia* — producers of surfactants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series*, 2017, 4: 73—80.

34. Pirog T.P., Panasyuk E.V., Nikityuk L.V., Iutinska G.O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants. *Biotechnologia Acta*, 2016, 9(1): 38—47. https://doi.org/10.15407/biotech9.01.038.

35. Pirog T.P., Nikituk L.V., Antonuk S.I., Shevchuk T.A., Iutynska G.O. 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. http://microbiolj.org.ua/en/archiv/-2017-tom-79/2-mar-apr-tom-79/2017-79-2-02. Ukrainian.

36. Man L., Meng X.C., Zhao R. 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.

37. 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.

38. Somkuti G.A., Steinberg D.H. 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.

39. Mathys S., Meile L., Lacroix C. Co-cultivation of a bacteriocin-producing mixed culture of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and *Pediococcus acidilactici* UVA1 isolated from baby faeces. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 107(1): 36—46. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04186.x.

40. Chang J.Y., Lee H.J., Chang H.C. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 103(6): 2504—2515.

41. Zhang L., Niaz S.I., Khan D., Wang Z., Zhu Y., Zhou H., Lin Y., Li J., Liu L. Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. (Strain 307) by co-cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (Strain B2). *Mar. Drugs*. 2017, 15(2). doi: 10.3390/md15020035.

42. Dashti Y., Grkovic T., Abdelmohsen U.R., Hentschel U., Quinn R.J. Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiopsis* sp. RV163. *Mar. Drugs*. 2014. 12(5): 3046—3059. doi: 10.3390/md12053046.

43. Pathak R., Kumar R., Gautam H.K. Cross-species induction and enhancement of antimicrobial properties in response to gamma irradiation in *Exiguobacterium* sp. HKG 126. *Indian J. Microbiol.* 2013, 53(2): 130—136. doi: 10.1007/s12088-013-0369-0.

44. 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.