

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“03” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ЯРОВОЇ Ганни Анатоліївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Регуляція антимікробної та антиадгезивної активності
поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

керівник роботи ПИРОГ Тетяна Павлівна, д.б.н., проф.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кx

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-
7241; цільовий продукт: поверхнево-активні речовини.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Очищений гліцерин і відходи виробництва біодизелю як субстрати для одержання
мікробних поверхнево-активних речовин. Матеріали і методи досліджень. Вплив
катіонів кальцію на біологічну активність поверхнево-активних речовин
Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241. Біологічна активність поверхнево-
активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за
наявності біологічних індукторів.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Очищений гліцерин і відходи виробництва біодизелю як субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин	03.11.2021 – 23.11.2021	
2	Матеріали і методи досліджень	24.11.2021 – 04.12.2021	
3	Вплив катіонів кальцію на біологічну активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241.	05.12.2021 – 04.01.2022	
4	Біологічна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів	05.01.2022 – 24.01.2022	
5	Оформлення пояснювальної записки	25.01.2022 – 01.02.2022	

Здобувач _____
(підпис)

Ганна ЯРОВА
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна ПИРОГ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) під час культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення і підвищеним вмістом катіонів кальцію (активаторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність комплексу ПАР) та за наявності у середовищі вирощування продуцента ПАР біологічних індукторів (живі та інактивовані клітини *Bacillus subtilis* БТ-2 і супернатант).

Встановлено, що додаткове внесення 0,1–0,2 г/л CaCl₂ у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) яких щодо бактерій і дріжджів були у 1,4–29 разів нижчими, адгезія тест-культур на абіотичних матеріалах, оброблених такими ПАР, була на 8–13 % нижчою, а ступінь руйнування біоплівки на 5–19 % вищим порівняно з показниками, встановленими на базовому середовищі. Підвищення біологічної активності ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, спостерігали лише за внесення у середовище хлориду кальцію у концентрації 0,2 г/л. Найефективнішими з використовуваних індукторів виявилися живі клітини *B. subtilis* БТ-2: внесення їх у середовище з обома субстратами супроводжувалося синтезом ПАР, МІК яких щодо бактерій та дріжджів були у 2-8 разів нижчими, ступінь руйнування біоплівки у 1,5-8 разів вищим, а адгезія тест-культур на абіотичних матеріалах на 16-44 % нижчою у порівнянні з показниками антиадгезивної активності ПАР, утворених без індуктора.

Кваліфікаційна робота складається зі 104 сторінок машинописного тексту, 19 таблиць та 95 літературних джерел.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, активатори ферментів, індуктор, антимікробна і антиадгезивна активність, руйнування біоплівки.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
------------	---

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОЧИЩЕНИЙ ГЛІЦЕРИН І ВІДХОДИ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ ЯК СУБСТРАТИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	9
--	---

1.1. Особливості біосинтезу поверхнево-активних речовин на гліцерині різного ступеня очищення	9
--	---

1.1.1. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин на очищеному гліцерині.....	9
--	---

1.1.2. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин на відходах виробництва біодизелю	15
--	----

1.2. Біологічна активність мікробних поверхнево-активних речовин, синтезованих на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю	23
---	----

1.2.1. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин	23
---	----

1.2.2. Антиадгезивна дія поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині.....	33
---	----

1.3. Перспективи практичного використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення	36
--	----

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	42
--	----

2.1. Об'єкти досліджень.....	42
------------------------------	----

2.2. Умови культивування <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB В-7241	42
--	----

2.3. Одержання безклітинних екстрактів.....	43
---	----

2.4. Визначення НАДФ ⁺ -залежної глутаматдегідрогеназної активності	44
--	----

2.5. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин і одержання препаратів ПАР.....	44
---	----

2.6. Дослідження антимікробної активності ПАР	45
---	----

2.7. Визначення антиадгезивної активності ПАР	46
---	----

2.8. Дослідження ступеня деструкції біоплівки за дії ПАР	47
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КАТІОНІВ КАЛЬЦІЮ НА БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ	
ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i>	
ІМВ В-7241	48
3.1. Вплив катіонів кальцію на активність НАДФ ⁺ -залежної глутаматдегідрогеназної активності у <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241 .	48
3.2. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності різних концентрацій катіонів кальцію	49
3.3. Вплив катіонів кальцію на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин	54
3.4. Деструкція біоплівок за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію	61
РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН	
<i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА	
НАЯВНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ІНДУКТОРІВ	
66	
4.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності біологічних індукторів	66
4.2. Здатність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В- 7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів, до руйнування біоплівок.....	72
4.3. Вплив біологічних індукторів на антиадгезивну активність поверхнево- активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	80
ВИСНОВКИ.....	86
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	88

ВСТУП

Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) є продуктами мультифункціонального призначення, оскільки вони здатні не тільки знижувати поверхневий натяг на межі поділу фаз і емульгувати різні субстрати, а й проявляти антимікробну і антиадгезивну активність (у тому числі й здатність до руйнування біоплівки). Проте в різних умовах культивування продуцентів склад ПАР і їх властивості можуть змінюватися. Це зумовлено тим, що мікробні ПАР є вторинними метаболітами, які синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, склад і співвідношення яких може змінюватися залежно від умов вирощування продуцента, що в свою чергу спричинятиме і зміну властивостей цільового продукту [1].

Упродовж останніх років було здійснено порівняння антимікробної активності ПАР *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення [1], і було встановлено, що ПАР, синтезовані штамом ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю, виявилися менш ефективними антимікробними агентами порівняно з препаратами, отриманими на очищеному гліцерині.

Інтерес до відходів виробництва біодизелю зумовлений тим, що проблемою сьогодення є необхідність утилізації великої кількості токсичних промислових відходів. Одним з найефективніших способів знешкодження таких відходів є використання їх як субстратів для культивування мікроорганізмів з метою одержання практично цінних продуктів, зокрема, поверхнево-активних речовин, що дасть змогу суттєво знизити собівартість цільового продукту і підвищити ефективність біотехнологічного виробництва [1].

У доступній літературі відсутня інформація щодо шляхів регуляції біологічної активності ПАР у процесі культивування продуцента, натомість зазначається, що основними підходами до регуляції біологічних властивостей

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярова Г.А.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пирог Т.П.					7	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

мікробних ПАР є їх постферментаційна хімічна модифікація, а також вдосконалення штамів-продуцентів методами метаболічної та генетичної інженерії [2].

У той же час у роботі [3] було встановлено позитивний вплив катіонів кальцію у середовищі з етанолом на НАДФ⁺-залежну глутаматдегідрогеназну активність ключового ферменту біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів у *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, відповідальних за антимікробну активність ПАР. Додаткове внесення у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 катіонів кальцію супроводжувалось підвищенням антимікробної та антиадгезивної активності синтезованих на етанолі поверхнево-активних речовин.

Крім того, останнім часом у літературі з'являється все більше робіт, присвячених спільному культивуванню мікроорганізмів з біологічними індукторами, присутність яких зумовлює посилення біологічної активності цільових метаболітів [4, 5].

У зв'язку з викладеним вище, мета даної роботи – дослідити вплив катіонів кальцію та біологічних індукторів на антимікробну та антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин за умов вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ОЧИЩЕНИЙ ГЛІЦЕРИН І ВІДХОДИ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ ЯК СУБСТРАТИ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Заміна традиційних субстратів промисловими відходами – корисна стратегія зниження високої собівартості поверхнево-активних речовин у сучасному світі. Дослідження цього питання стосується у першу чергу відходів нафтоперероблюючих заводів чи виробництв, діяльність яких спрямована на виготовлення білкових продуктів. Разом з тим, такі відходи містять значну частину поживних речовин та мінералів, тому їх може бути використано у промисловості для синтезу практично цінних речовин. Гліцерин, отриманий шляхом переетифікації масел для виробництва біодизелю, може бути цінним альтернативним джерелом вуглецю для культивування мікроорганізмів, зважаючи на обсяги розширення біодизельної промисловості та накопичення надлишку відходів виробництва біопалива [6].

1.1. Особливості біосинтезу поверхнево-активних речовин на гліцерині різного ступеня очищення

Основна частина інформації, що представлена у доступній літературі, присвячена дослідженню особливостей біосинтезу мікробних поверхнево-активних речовин у середовищі з очищеним гліцерином [7-24].

1.1.1. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин на очищеному гліцерині

Рамноліпіди. У більшості робіт зі встановлення можливості використання очищеного гліцерину як субстрату синтезовані поверхнево-активні речовини були представлені рамноліпідами [7-16]. Так, Егаці зі співавторами [7] встановили, що культивування *Pseudomonas aeruginosa* WAЕ у середовищі з очищеним

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Очищений гліцерин і відходи виробництва біодизелю як субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ярова Г.А.					9	33
Перевір.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

гліцерином (1%, об'ємна частка) супроводжувалось утворенням ПАР у кількості 2,164 г/л, у той час як за присутності гліцерину у кількості 0,5, 2 і 3 % (об'ємна частка) спостерігали нижчий рівень синтезу рамноліпідів – всього 1,35-1,45 г/л.

Інші дослідники у роботі [8] проводили інтенсифікацію синтезу рамноліпідів зміною співвідношення джерела карбону та нітрогену у середовищі культивування *P. aeruginosa* RS29. Так, за співвідношення C/N 12,5 спостерігали найвищий рівень синтезу комплексу ПАР 5,6 г/л (0,8 г/л очищених рамноліпідів), а за співвідношень 2,5, 7,5, 17,5 та 22,5 концентрація ПАР була нижчою – 2-3,9 г/л.

Аналогічний підхід до оптимізації умов синтезу рамноліпідів використали і Wu зі співавторами [9]. Експерименти показали, що при 40 г/л гліцерину концентрація ПАР становила 4,9 г/л, однак використання нітрату натрію як джерела азоту збільшило кількість синтезованих ПАР до 8,6 г/л. На наступному етапі було показано, що оптимальним співвідношенням C/N є 52. Внаслідок проведення ряду досліджень з використанням методу відгуку поверхні (RSM) для визначення оптимальної концентрації критичних компонентів середовища (джерела вуглецю та азоту) встановили, що за наявності 18,1 г/л гліцерину та 4,9 г/л NaNO_3 відповідно рівень синтезу рамноліпідів досягав максимального значення 12,6 г/л, що на 47% вище, порівняно з попередніми результатами (8,6 г/л).

Автори статті [10] використовували такі підходи до інтенсифікації рамноліпідів як зміну рН (5-11), температурного режиму (15, 30, 45 °C) та джерела нітрогену – NH_4Cl , NH_4NO_3 , NaNO_2 , NaNO_3 , NH_4SO_4 . Було встановлено, що за культивування *P. aeruginosa* A11 у середовищі з очищеним гліцерином (3%, об'ємна частка), NaNO_3 (10 ммоль/л) за рН 7 та температури 30 °C концентрація синтезованих ПАР була найвищою і становила 4,43 г/л. Дослідники зазначили, що синтезовані ПАР є ди-рамноліпідами, основна фракція яких представлена L-рамнозил-L-рамнозил-b-гідроксидеканоїл-b-гідроксидеканоатом.

Подібні закономірності встановили і у роботі [11] – синтез ПАР також інтенсифікували зміною джерела нітрогену у середовищі культивування *P.*

aeruginosa CR1. Так, при вирощуванні штаму CR1 за присутності 3% (об'ємна частка) очищеного гліцерину, додаткового внесення 30 г/л гліцерину та 1 г/л NaNO_3 як додаткового джерела нітрогену рівень синтезу рамноліпідів був дещо вищий 21,83 г/л, порівняно з показниками синтезу за присутності інших сполук нітрогену – NH_4NO_3 та NH_4Cl (20,88 та 20,9 відповідно), а також контрольним зразком (без додаткового джерела нітрогену) – 21,77 г/л.

Оптимізацію умов синтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* RG18 зміною концентрації субстрату, джерела нітрогену та співвідношення кількості ріпакового шроту до кількості пшеничних висівок проводили автори статті [12]. Так, за концентрації очищеного гліцерину 50 г/л, NaNO_3 у кількості 6 г/л, а також при наявності шроту та висівок у співвідношенні 5:5 спостерігали найвищий рівень синтезу рамноліпідів – 16 г/л. Інші концентрації субстрату (20-70 г/л), джерела азоту (0-12 г/л) та співвідношення ріпаку до висівок (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 4:6, 3:7) зумовлювали зниження концентрації ПАР – 8-13 г/л. Дослідники зазначили, що при зменшенні кількості ріпаку відповідно зменшувалась і концентрація рамноліпідів, оскільки наявність залишкового тригліцериду у ріпаковому шроті сприятливо впливала на рівень синтезу ПАР.

Вплив концентрації субстрату на рівень біосинтезу мікробних ПАР рамноліпідної та ліпопептидної природи встановлювали і у роботі [13]. Показано, що найвищу концентрацію сурфактину 0,02 г/л спостерігали при вирощуванні *Bacillus subtilis* N1 у середовищі з 2% (об'ємна частка) гліцерину, у той час як частка рамноліпідів була вищою – при культивуванні *P. aeruginosa* PAO1 за наявності 10% (об'ємна частка) очищеного гліцерину рівень синтезу рамноліпідів був максимальним і досягав 1,9 г/л.

Інші дослідники встановили можливість отримання мікробних ПАР у середовищі з меншою кількістю гліцерину (1%, об'ємна частка) [14]. Так, концентрація рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* NCIM 5514, становила 2,689 г/л.

Лі зі співавторами також встановили можливість синтезу рамноліпідних ПАР у гліцеринвмісному середовищі з наступним визначенням їх фізико-хімічних

властивостей [15]. Показано, що при вирощуванні *P. aeruginosa* YM4 за наявності 30 г/л очищеного гліцерину та такої ж кількості соєвої олії концентрація ПАР становила 23,9 г/л, при цьому частка ди-рамноліпідів (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) у складі синтезованих ПАР була 85,7%.

Інші дослідники встановили вплив аерації на рівень синтезу рамноліпідів [16]. Так, найбільшу концентрацію ПАР за вирощування штаму *P. aeruginosa* SG у середовищі з 70,3 г/л гліцерину спостерігали за аеробного культивування (11,65 г/л), у той час як за анаеробних умов концентрація рамноліпиду знижувалась до 0,68 г/л. Автори зазначили, що склад рамноліпідів теж залежав від вмісту кисню. Так, при анаеробних умовах у складі синтезованих ПАР було більше моно-рамноліпідів – до 94,7%, у той час як за аеробних умов їх частка знижувалась до 54,8%.

Таким чином, за культивування різних продуцентів у широкому діапазоні концентрацій субстрату (10-70,3 г/л) спостерігали відповідно різні концентрації рамноліпідів (0,02-21,83 г/л), однак варто звернути увагу на те, що підвищення концентрацій субстрату не завжди супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ПАР – наприклад, у роботі [16] наведено, що за наявності 70,3 г/л гліцерину концентрація ПАР становила 11,65 г/л і була нижчою, порівняно з показниками, наведеними у статті [12] – 16 г/л за наявності 50 г/л субстрату.

Софороліпіди. Окрім цього, нам також вдалось знайти відомості щодо синтезу софороліпідів у середовищі з очищеним гліцерином. Так, інтенсифікацію ПАР софороліпідної природи при культивуванні *Starmerella bombicola* ATCC 22214 проводили зміною додаткових субстратів [17]. При цьому, за вирощування продуцента у середовищі з очищеним гліцерином (15 г/л) та соняшниковою олією (10 г/л) концентрація ПАР становила 6,61 г/л і була вищою, порівняно з показниками синтезу софороліпідів за наявності гліцерину та пальмової олії у аналогічних концентраціях – 5,64 г/л.

Відомо, що метанол є інгібітором росту мікроорганізмів, у роботі [18] досліджували вплив цього спирту (до 1,5 %) також на синтез софороліпідів *S. bombicola* ATCC 22214 на суміші очищеного гліцерину (100 г/л) і олеїнової

кислоти (2 %, об'ємна частка). Такий субстрат являє собою модифікацію відходів виробництва біодизелю. Встановлено, що за відсутності метанолу у середовищі кількість синтезованих софороліпідів становила 12,7 г/л, а за підвищення концентрації спирту до 1,5 % спостерігали зниження кількості ПАР до 5,6 г/л.

Вплив наявності олеїнової та рицинової олії у середовищі культивування на концентрацію софороліпідів синтезованих *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 показано авторами статті [19]. Встановлено, що за культивування продуцента з 100 г/л гліцерину і такою ж кількістю олеїнової кислоти рівень синтезу ПАР був вищий (52,34 г/л), порівняно з показниками синтезу за наявності аналогічної концентрації рицинової олії – 24,42 г/л.

Отже, у літературі інформації про синтез софороліпідів різними штамми продуцентів на очищеному гліцерині наведено мало, концентрації субстратів (15-100 г/л) були вищі, порівняно з відомостями, описаними у вищезазначених статтях про синтез рамноліпідів [7-16], відповідно, концентрації отриманих софороліпідних ПАР також були вищими більш, ніж на порядок (6,6-52,34 г/л), у порівнянні з літературними даними про кількість синтезованих рамноліпідів (0,02-21,83 г/л).

Ліпопептиди. Вплив умов культивування на рівень синтезу ліпопептиду псевдофактину показано у статті [20]. Встановили, що вирощування *Pseudomonas fluorescens* BD5 у середовищі MSM з 10 г/л гліцерину супроводжувалось синтезом ліпопептиду у кількості 15,4 мг/л, у той час як додавання до середовища культивування 1,25 % (об'ємна частка) середовища LB супроводжувалось підвищенням концентрації ПАР до 20,9 мг/л.

Залежність рівня синтезу ліпопептидів від джерела нітрогену у середовищі з очищеним гліцерином (2%, об'ємна частка) встановили Phulpoto зі співавторами [21]. Так, за використання NH_4NO_3 (0,1%, об'ємна частка) як джерела азоту у середовищі культивування *Bacillus nealsonii* S2MT спостерігали найвищу концентрацію ПАР (1,3 г/л), у той час як за аналогічної концентрації сечовини та дріжджового екстракту рівень синтезу сурфактину був нижчим і становив 0,1-0,13 г/л.

Фракціонування ліпопептидних ПАР *Serratia marcescens* (штам не наведено) після їх культивування у гліцеринвмісному середовищі (12,6 г/л) протягом 168 год проводили у статті [22]. Було отримано 5 фракцій, найвищу кількість виділених ПАР спостерігали у фракції 2 – 46,7 мг/л, у той час як фракція 5 містила всього 3,7 мг/л ПАР.

Оптимізацію умов ліпопептидів, синтезованих представником роду *Serratia*, зміною кількості субстрату (3–7%, об'ємна частка) та джерела азоту (3–7 г/л), провели і Almansoory зі співавторами [23]. Так, встановлено, що найвищу концентрацію ПАР (1,42 г/л) зафіксували при культивуванні *Serratia marcescens* HDB у середовищі з 5% (об'ємна частка) гліцерину, 4 г/л пептону та 5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Зазначено, що оптимальний склад середовища було встановлено при рН 8, температурі 30 °С та після 120 год культивування.

Etchegaray зі співавторами показали можливість синтезу ліпопептидів за вирощування *Bacillus amyloliquefaciens* OG як на глюкозі, так і на гліцерині [24]. Показано, що за культивування штаму OG у середовищі з глюкозою (20 г/л) протягом 24 год концентрація фенгіцину становила 86 мг/л, а за використання гліцерину як субстрату у аналогічній концентрації кількість ПАР була меншою – 25 мг/л.

З огляду на вищеописане, можна підсумувати, що концентрації ліпопептидних ПАР, синтезованих різними продуцентами, були найнижчими (0,02-1,42 г/л), у порівнянні з наявними даними про кількість рамно- (0,02-21,83 г/л) та софороліпідів (6,6-52,34 г/л), при цьому діапазон концентрацій субстрату також був меншим (10-63 г/л), порівняно з кількістю субстрату для отримання інших ПАР.

Отже, вищенаведені дані засвідчують ефективність використання очищеного гліцерину як субстрату для синтезу поверхнево-активних речовин, оскільки у його складі відсутні тригліцериди, жирні кислоти, попіл, гідроксид натрію, а також інші побічні продукти каталізу, які здатні інгібувати ріст або навіть спричиняти загибель клітин продуцентів.

1.1.2. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин на відходах виробництва біодизелю

Однак останнім часом у літературі почало з'являтися все більше інформації про використання саме відходів виробництва біодизелю як субстрату для біосинтезу мікробних поверхнево-активних речовин [6, 26-33]. Такий субстрат є більш вигідним для біосинтезу практично цінних мікробних метаболітів, оскільки використання такого підходу дозволяє уникнути витрат ресурсів для очищення відходів виробництва біодизелю з одночасною їх утилізацією.

Рамноліпіди. Так, у 2020 році з'явилась стаття, автори якої встановили залежність рівня синтезу рамноліпідних ПАР від кількості інокуляту, за вирощування продуцента у середовищі з 95%-вим гліцерином та відходами виробництва біодизелю у концентрації 58,9 г/л [6]. Показано, що за внесення 0,53 та 0,85 г/л інокуляту у середовище культивування *P. aeruginosa*-estA з гліцерином різного ступеня очищення зафіксували практично однакові значення концентрації рамноліпідів, однак найвищі концентрації ПАР спостерігали при 1,28 г/л інокуляту – 17,6-18,1 г/л. Дослідники зазначили, що такі показники засвідчують можливість заміни очищеного гліцерину на відходи виробництва біодизелю.

Інтенсифікацію біосинтезу рамноліпідів штамів *P. aeruginosa* LBI та LBI 2A1 зміною початкової концентрації субстрату проводили у статті [25]. Так, найвищу концентрацію ПАР штамів LBI та LBI 2A1 (1,3 та 2,55 г/л відповідно) спостерігали при їх культивуванні за наявності 50 г/л відходів виробництва біодизелю, у той час як за інших концентрацій субстрату (5-150 г/л) рівень синтезу ПАР був нижчим і становив 0,002-0,925 г/л.

Аналогічний підхід використали і автори роботи [26]. Окрім цього, було проведено визначення оптимального джерела азоту, його концентрації та часу культивування. Так, за вирощування *P. aeruginosa* UCP0992 протягом 96 год у середовищі з 3% (об'ємна частка) відходів виробництва біодизелю та 0,6 % (об'ємна частка) NaNO_3 концентрація рамноліпідів досягла найвищого значення 8 г/л, у той час як при вирощуванні штаму UCP0992 протягом 120 год за інших

концентрацій субстрату (2, 5 та 7 %, об'ємна частка) та джерела азоту (0,05-0,4 %, об'ємна частка) кількість синтезованих ПАР була меншою – 2-5,5 г/л.

Інші дослідники у роботі [27] показали можливість одержання рамноліпідів за вирощування *P. aeruginosa* MSIC02 на відходах виробництва біодизелю. Так, встановлено, що максимальна концентрація рамноліпідів (1,27 г/л) спостерігалася при культивуванні досліджуваного штаму на середовищі, що містило 18 г/л відходів виробництва біодизелю, 4 г/л NaNO_3 , 62 мМ KH_2PO_4 при рН 7,0 та температурі 37°C. Окрім цього, автори зазначили, що синтезовані рамноліпіди проявляли досить високу емульгуювальну активність (E_{24} 65%) за використання мінеральних та рослинних олій як субстратів.

Синтез рамноліпідів штамом *P. aeruginosa* TGC01 при його культивуванні у середовищі з відходами виробництва біодизелю, описали Bezerra зі співавторами [28]. Показано, що за присутності 40 г/л субстрату концентрація рамноліпідних ПАР становила 11 г/л.

Інші гліколіпіди. Konishi зі співавторами встановили можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних софороліпідів при вирощуванні *Candida floricola* ZM1502 у середовищі з відходами виробництва біодизелю (100 г/л) зміною джерела нітрогену [29]. Встановлено, що за наявності сечовини (3 г/л) як джерела азоту концентрація синтезованих ПАР становила 5,1 г/л, у той час як використання NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ супроводжувалось нижчими показниками синтезу софороліпідів – 2-3,9 г/л. При додатковому внесенні 50 г/л додаткового гідрофобного субстрату було зафіксовано збільшення концентрації синтезованих софороліпідів. Так, за присутності соєвої олії спостерігали вищі показники синтезу ПАР (42,1 г/л), ніж при внесенні олеїнової кислоти як додаткового субстрату – 37,5 г/л.

Маннозилеритритол(MEL)-ліпіди вважають перспективним класом поверхнево-активних речовин, оскільки вони не тільки проявляють достатньо високу поверхневу активність, але і різноманітну біохімічну дію, включаючи активність диференціювання клітин відносно різних клітин ссавців. Крім цього, MEL-ліпіди здатні підвищувати ефективність трансфекції генів, що

опосередкована катіонними ліпосомами. Раніше встановлено, що для синтезу таких ПАР використовували соєву олію, але застосування такого субстрату ускладнює процеси виробництва та виділення, оскільки відбувається синтез таких побічних продуктів біосинтезу як вільні жирні кислоти, моно- та діацилгліцерини [30]. Тому у роботі [30] дослідники вирішили встановити можливість культивування таких ПАР у середовищі з відходами виробництва біодизелю. За початкової концентрації субстрату 6-14 % (об'ємна частка) та різного температурного режиму культивування (20-35 °C) спостерігали рівень синтезу ПАР у діапазоні 0,3-4 г/л. При цьому, найвища концентрація MEL-ліпідів 4 г/л спостерігалась за вирощування штаму у середовищі з 10 % (об'ємна частка) відходів виробництва біодизелю при 30 °C. Також було показано, що завдяки дробному внесенню додаткової кількості субстрату у аналогічній концентрації вдалось збільшити кількість синтезованих ПАР до 16,3 г/л.

Також у літературі представлено відомості щодо можливості *Ustilago maydis* L8 споживати відходи виробництва біодизелю з подальшим синтезом гліколіпідів [31]. З метою встановлення оптимальної концентрації субстрату у середовище культивування додавали від 10 до 50 г/л відходів виробництва біодизелю. Так, концентрацію 7 г/л гліколіпідів зафіксовано на середовищі з 50 г/л субстрату та 1,6 г/л цитрату амонію.

Ліпопептиди. Разом з тим, нам вдалось знайти інформацію і щодо інтенсифікації біосинтезу ліпопептидних ПАР. Так, у роботі [32] показано вплив наявності L- та D-лейцину на синтез сурфактину *Bacillus velezensis* BS-37 за вирощування штаму у середовищі з відходами виробництва біодизелю у кількості 2% (об'ємна частка). Встановлено, що за вирощування продуцента протягом 36 год рівень синтезу сурфактину становив 1 г/л, у той час як додавання 10 мМ L-лейцину супроводжувалось підвищенням концентрації ПАР удвічі (2 г/л), а при аналогічній кількості D-лейцину спостерігали зниження рівня синтезу ліпопептиду до 0,25 г/л. Такий ефект дослідники пояснюють тим, що L-форма лейцину сприймалась продуцентом як субстрат, у той час як D-форма сприяла зниженню концентрації ПАР, діючи як конкурентний інгібітор.

Окрім цього, на кафедрі біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій дослідниками було проведено встановлення можливості використання відходів виробництва біодизелю як субстрату для синтезу позаклітинних поверхнево-активних речовин. Так, за культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 у середовищі з 2-4% (об'ємна частка) відходів виробництва біодизелю спостерігали максимальні показники синтезу ПАР – 1,6, 4,2 та 5,6 г/л відповідно. Автори зазначили, що при вирощуванні продуцентів на очищеному гліцерині зафіксували нижчі концентрації ПАР. Так, за наявності у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 очищеного гліцерину (1%, об'ємна частка) концентрація отриманих ПАР становила 0,5 г/л, штаму IMB B-7241 – 2,4 г/л, а штаму IMB B-7405 – 1,8 г/л [33].

Узагальнені відомості щодо результатів синтезу ПАР у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення наведено у табл. 1.1.

Синтез мікробних поверхнево-активних речовин на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю

Гліцерин як субстрат	Продуцент	Концентрація субстрату у середовищі	Хімічний склад ПАР	Концентрація ПАР, г/л	Література
Очищений	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WAE	1%, об'ємна частка	Рамноліпіди	2,164	[7]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RS29	25 г/л	Рамноліпіди	0,8	[8]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1	40 г/л	Рамноліпіди	4,9	[9]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A11	3%, об'ємна частка	Рамноліпіди	4,43	[10]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CR1	3%, об'ємна частка, 30 г/л	Рамноліпіди	21,83	[11]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RG18	50 г/л	Рамноліпіди	16	[12]
	<i>Bacillus subtilis</i> N1	2%, об'ємна частка	Ліпопептиди	0,02	[13]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	10%, об'ємна частка	Рамноліпіди	1,9	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIM 5514	1%, об'ємна частка	Рамноліпіди	2,689	[14]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> YM4	30 г/л	Рамноліпіди	23,9	[15]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG	70,3, г/л	Рамноліпіди	11,65	[16]
	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	15 г/л	Софороліпіди	6,6	[17]
	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	100 г/л	Софороліпіди	12,7	[18]
	<i>Starmerella bombicola</i> NRRL Y-17069	100 г/л	Софороліпіди	52,34	[19]
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BD5	10 г/л	Ліпопептиди	0,02	[20]
	<i>Bacillus nealsonii</i> S2MT	2%, об'ємна частка	Ліпопептиди	1,3	[21]
	<i>Serratia marcescens</i> (штам не наведено)	12,6 г/л	Ліпопептиди	0,046	[22]
	<i>Serratia marcescens</i> HDB	5%, об'ємна частка	Ліпопептиди	1,42	[23]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OG	20 г/л	Ліпопептиди	0,025 г/л	[24]	
Відходи виробництва біодизелю	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -estA	58,9 г/л	Рамноліпіди	18,1	[6]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	50 г/л	Рамноліпіди	1,3	[25]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1			2,55	

Продовження таблиці 1.1

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	3%, об'ємна частка	Рамноліпіди	8	[26]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MSIC02	18 г/л	Рамноліпіди	1,27	[27]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC01	40 г/л	Рамноліпіди	11	[28]
<i>Candida floricola</i> ZM1502	100 г/л	Софороліпіди	42,1	[29]
<i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317 ^T	10%, об'ємна частка	Маннозилеритритол ліпіди	16,3	[30]
<i>Ustilago maydis</i> L8	50 г/л	Гліколіпіди	7	[31]
<i>Bacillus velezensis</i> BS-37	2%, об'ємна частка	Ліпопептиди	2	[32]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	2%, об'ємна частка	Комплекс гліко- та аміноліпідів	5,6	[33]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ac-5017	4%, об'ємна частка	Комплекс нейтральних, гліко-, фосфо- і аміноліпідів	1,6	
<i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	4%, об'ємна частка	Комплекс нейтральних, гліко- і аміноліпідів	4,2	

З огляду на дані, узагальнені у табл. 1.1., можна зазначити, що за вирощування різних продуцентів у широкому діапазоні концентрацій (18-100 г/л) відходів виробництва біодизелю спостерігали досить високі показники синтезу ПАР – 1,3-42,1 г/л, однак підвищення кількості субстрату не завжди супроводжувалось підвищенням кількості ПАР. При вирощуванні мікроорганізмів у середовищі з відходами виробництва біодизелю спостерігали вищий рівень синтезу ПАР – концентрація в середньому була у 1,5-2 рази вищою, порівняно з показниками, встановленими для очищеного гліцерину, за однакової концентрації субстратів, однак автори описаних робіт використовували для досліджень різні штами продуцентів.

У доступній літературі також представлено відомості щодо синтезу ПАР на інших субстратах, зокрема традиційних та відходах різних виробництв [34-37]. Так, у роботі наведено інформацію про синтез ПАР представниками роду *Rhodococcus* на різних гідрофільних та гідрофобних субстратах, а також їх сумішах [34]. Показано, що при культивуванні різних продуцентів у середовищі з вуглеводневими субстратами (гексадекан, сира нафта, дизельне паливо, гас) у концентраціях 1-5,7 % (об'ємна частка) кількість ПАР становила 0,5-13,5 г/л, після проведення оптимізації умов культивування зростає до 1,95-30,1 г/л, у свою чергу, при використанні олієвмісних субстратів (2-5 %, об'ємна частка) рівень синтезу ПАР був аналогічний показникам до оптимізації – 0,4-13,7 г/л. Разом з тим, культивування штамів за присутності 5-20 г/л гідрофільних субстратів (гліцерин, глюкоза, крохмаль, сахароза, етанол) супроводжувалось зниженими концентраціями ПАР (0,3-1,7 г/л), у той час як дещо більшу кількість 3,4 г/л зафіксували при використанні відходів виробництва біодизелю (8%, об'ємна частка) як субстрату. За умов росту штамів на суміші джерел вуглецю (гексадекан+манітол, дизельне паливо+меляса, гас+меляса, оливкова олія+глюкоза) кількість синтезованих ПАР була у діапазоні 3,9-10,9 г/л.

Використання глюкози, сахарози, крохмалю та промислових відходів виробництв для синтезу ПАР бактеріальними та дріжджовими продуцентами наведено і у праці [35]. За наявності традиційних субстратів (8-150 г/л) кількість

ПАР становила 0,3-95,4 г/л, у той час як за вищих концентрацій бурякової меляси, картопляних, апельсинових та бананових шкірок, відпрацьованих олій та інших промислових відходів (10-250 г/л) рівень синтезу ПАР був трохи нижчим – 0,005-84,6 г/л.

Аналогічне використання різноманітних субстратів для отримання поверхнево-активних рамноліпідів описано і у роботі [36]. Показано, що культивування різних штамів представників родів *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces* та інших у середовищі з глюкозою, гексадеканом, манітолом (0,4-4 %, об'ємна частка) супроводжувалось синтезом ПАР у концентраціях 0,04-46,8 г/л, у той час як вищий рівень синтезу спостерігали при використанні відпрацьованих олій, меляси, гліцерину (0,18-8%, об'ємна частка) як субстратів – 0,51-70,56 г/л.

У огляді [37] також підсумовано відомості про застосування нетрадиційних субстратів для синтезу мікробних поверхнево-активних речовин представниками родів *Bacillus*, *Pseudomonas* та *Candida*. Так, наявність відпрацьованих олій, тваринного жиру та інших субстратів у концентраціях 40-80 г/л та 2-5 % (об'ємна частка) супроводжувалось синтезом ПАР у кількості 7-61 г/л.

З огляду на вищеописане, можна зробити висновок, що відходи виробництва біодизелю не поступаються іншим промисловим відходам, а також іншим речовинам, які використовують як традиційний субстрат для синтезу мікробних поверхнево-активних речовин. Окрім цього, заміна очищеного гліцерину на відходи виробництва біодизелю може забезпечити зниження собівартості отриманих ПАР через відсутність необхідності видалення домішок, що містяться у промислових відходах.

1.2. Біологічна активність мікробних поверхнево-активних речовин, синтезованих на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю

Більшість літературних даних щодо антимікробної активності стосується поверхнево-активних речовин, які було отримано внаслідок культивування продуцентів у середовищі з очищеним гліцерином [38-52], у той час як відомостей про використання відходів виробництва біодизелю як субстрату налічується менше [53-57]. При цьому інформації щодо дії ліпопептидів представлено більше [38-45], порівняно з даними щодо активності рамноліпідів [41, 47-51, 53] та інших ПАР [52, 55-57].

Антимікробну активність у цих роботах дослідники визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрація (МІК) [38-40, 47-49, 55-57], диско-дифузійним методом [41-45, 52-53], а також за інгібуванням росту тест-культури [50, 51].

1.2.1. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин

Ліпопептиди. Так, автори роботи [38] встановили антимікробну дію ліпопептидних ПАР *Bacillus circulans* (штам не вказано), синтезованих у середовищі з гліцерином (2%, об'ємна частка), щодо тест-культур бактеріального та грибного походження за показником мінімальної інгібуючої концентрації. Показано, що МІК ПАР щодо *Escherichia coli* NCIM 2931, *Micrococcus flavus* NCIM 2376, *Proteus vulgaris* NCIM 2857 та *Staphylococcus aureus* MRSA були у діапазоні 50-300 мкг/мл, у той час як щодо *Aspergillus niger* та *Candida albicans* – 200 та 100 мкг/мл відповідно.

Антимікробну дію ліпопептидів *Bacillus thuringiensis* rak2310, отриманих на гліцерині (3%, об'ємна частка), щодо збудника епідемічного в'янення бананів у Панамі наведено у роботі [39]. Встановлено, що МІК таких ліпопептидів щодо *Fusarium oxysporum* становила 0,05 мг/мл.

У статті [40] наведено дані про ефективність мікробних ПАР щодо дерматофітів та збудників захворювань рослин. Автори зазначили, що культивування *Bacillus amylofaciens* AR2 у середовищі з глюкозою (62 г/л) супроводжувалось синтезом ліпопептидів, МІК яких щодо грибів роду *Fusarium*

(*F.solani* ATCC 36031, *F. oxysporum* MTCC 7229), *Alternaria* (*A. alternata* MTCC 2724, *A. citri* MTCC 4875) та інших (*Cladosporium cladosporoides* ATCC 16022, *Scopulariopsis acremonium* ATCC 58636, *Microsporium gypseum* MTCC 4522, *Trichophyton rubrum* MTCC 296) були у діапазоні 125-750 мкг/мл.

Порівняння ефективності ПАР *B. amyloliquefaciens* ST34 та *P. aeruginosa* ST5, синтезованих на очищеному гліцерині (3%, об'ємна частка), щодо тест-культур бактеріального та грибного походження встановлено у статті [41]. Так, за дії сурфактину штаму ST34 у концентрації 0,26 мг/мл зони затримки росту *E. coli* B170 та H10407, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* S1 та S2 були у діапазоні 17,7-25,3 мм, у той час як за дії рамноліпідів штаму ST5 (1 мг/мл) затримка росту тест-культур *E. coli* (ATCC 13706, ATCC 43892, B170, 3591-87, K4ССА), *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. faecalis* S2 та *Bacillus cereus* ST18 становила 17,7-29,3 мм. Крім цього, ПАР виявляли дію щодо штамів *Cryptococcus neoformans* САВ1055, САВ844 та САВ1034 – зони затримки становили 15,3-18,3 мм.

Пізніше ці ж автори у роботі [42] показали, що ПАР штаму ST34 у концентрації 10 мг/мл зумовлювали зони затримки росту штамів *Acinetobacter baumannii* АВ 4, *E. coli* ЕС 5, *Klebsiella pneumoniae* КР 1 та *P. aeruginosa* РА 3 у діапазоні 11,7-17,7 мм.

Автори роботи [43] показали, що ПАР *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP5009, синтезовані у середовищі з гліцерином (10 мл/л) у кількості 100 мкл проявляли антимікробну дію щодо бактерій (*B. subtilis* NRRL В-543, *S. aureus* RCMB010010, *S. typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC25955) та грибів (*Aspergillus fumigates* RCMB 002002, *C.albicans* ATCC 10231). Так, зони затримки росту вищезазначених тест-культур були у межах 12,07-26,07 мм.

Антимікробну активність ПАР *Serratia marcescens* P1 встановили у роботі [44]. Показано, що зони затримки росту *P. aeruginosa* S168 та РА3, *E. faecalis* S1, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 та *C. albicans* ATCC 66027 були у межах 18-25 мм.

Інші дослідники у статті [45] показали ефективність ліпопептидних ПАР, синтезованих *Serratia surfactantifaciens* sp. nov. YD25^T на гліцеринвмісному середовищі (концентрація субстрату не зазначена) щодо ряду патогенів. Так, найбільші зони затримки росту 11,2-19,4 мм спостерігали за дії розчину ПАР на *S. aureus* (штами С3, Е1, Е4), *P. aeruginosa* А62, *Rhodococcus rhodochrous* CGMCC 4.1815 та *Micrococcus luteus* CGMCC 1.2299.

Отже, у деяких наявних роботах за дії ліпопептидів, синтезованих різними продуцентами у гліцеринвмісному середовищі, зони затримки росту тест-культур становили 11,2-26,07 мм, в іншій половині робіт наведено, що мінімальні інгібуючі концентрації таких ПАР щодо різних мікроорганізмів були у діапазоні 50-1000 мкг/мл, у той час як значення МІК ліпопептидів, отриманих на інших субстратах [46] були набагато нижчими – у межах 1-32 мкг/мл. Крім цього, мінімальні інгібуючі концентрації ліпопептидів, отриманих на гліцерині, щодо грибів були вищими (50-1000 мкг/мл), порівняно з дією на бактеріальні тест-культури (50-300 мкг/мл), аналогічну закономірність наведено і у роботі [46].

Таким чином, інформації щодо антимікробної активності ліпопептидів, отриманих у гліцеринвмісному середовищі, наведено недостатньо для порівняння їх дії з показниками активності ПАР, синтезованих на інших субстратах, але оскільки МІК таких ПАР щодо різних тест-культур (зокрема, щодо бактеріальних) є вищими, то відповідно це свідчить про їх нижчу антимікробну дію.

Гліколіпіди. Серед гліколіпідів найбільш відомими та вивченими поверхнево-активними речовинами є рамноліпіди, що складаються з однієї або двох одиниць рамнози, зв'язаних β-глікозидним зв'язком з 3- (гідроксиалканойлокси)алкановою кислотою довжиною від 8 до 16 атомів Карбону. На сьогодні виявлено більше ста гомологів рамноліпідів та показано, що вони відрізняються один від одного переважно довжиною ланцюгів жирних кислот та ступенем ненасиченості [47].

Так, ефективність рамноліпідів *Pseudomonas gessardii* M15 щодо *S. aureus* 6538P та інших тест-культур (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* 13637) встановили дослідники у статті [47].

Встановлено, що мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, отриманих у середовищі з очищеним гліцерином (1%, об'ємна частка), становили 6,25 та 3,13 мкг/мл відповідно.

Перспективність використання галофільної бактерії *Halomonas elongata* ВК-AG18 для синтезу ПАР наведено у роботі [48]. Рамноліпіди, отримані у середовищі з гліцерином (3%, об'ємна частка) проявляли антимікробну активність щодо *S. aureus* – мінімальна інгібуюча концентрація становила 433 мкг/мл.

Вплив типу джерела вуглецю на антифунгальну активність рамноліпідів *P. aeruginosa* SS14 щодо збудників дерматофітозу (грибкової інфекції, яка вражає приблизно чверть світового населення) визначили Sen зі співавторами [49]. Як субстрати використовували глюкозу, гліцерин, манітол та патоку у кількості 10% (об'ємна частка). Показано, що ПАР, отримані у середовищі з гліцерином, проявляли антимікробну дію щодо *Trichophyton rubrum* – МІК становили 0,5 мг/мл, у той час як антифунгальна активність таких рамноліпідів щодо *T. mentagrophytes* була зафіксована за нижчої мінімальної інгібуючої концентрації 0,125 мг/мл.

Відомо, що збудником кореневої гнилі кокосів є фітопатогенний гриб *Pythium myriotylum*. Так, автори статті [50] показали ефективність рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* PNA1 у середовищі з гліцерином (1,5 %, об'ємна частка) щодо фітопатогену *P. myriotylum*. Встановлено, що за концентрацій рамноліпідів 0,025-2,5 мкг/мл міцеліальний ріст вищенаведеної тест-культури становив від 10,2 до 4,5 см² і був нижчим, у порівнянні з контрольним зразком без обробки (11,5 см²).

Антифунгальну активність рамноліпідів *P. aeruginosa* DS9, отриманих на різних субстратах (2%, об'ємна частка), щодо збудника червоної гнилі цукрової тростини встановили у статті [51]. Так, найвищий ступінь інгібування росту *Colletotrichum falcatum* спостерігали за дії ПАР, синтезованих на глюкозі та гліцерині (84,7 та 82,5% відповідно), у той час як при вирощуванні на манітолі, патоці та гексадекані спостерігали нижчу активність – 67,5-80%.

Регуляцію антимікробної дії гліколіпідвмісних супернатантів, отриманих після культивування представників роду *Lactobacillus*, в залежності від типу

субстрату визначили Mouafo зі співавторами у роботі [52]. Показано, що ефективність гліколіпідів у складі супернатантів *L. delbrueckii* N2, *L. cellobiosus* TM1 та *L. plantarum* G88, отриманих у середовищі з очищеним гліцерином (9%, об'ємна частка), була вищою, порівняно з показниками при вирощуванні штамів-продуцентів у середовищі з такою ж кількістю патоки цукрової тростини. Так, зони затримки росту *Bacillus* sp. BC1, *E.coli* E2B та *S. aureus* STP1 за дії ПАР, отриманих на гліцерині та патоці, становили 19-57,5 мм та 17-31 мм відповідно.

Разом з тим, вдалось знайти одну статтю, автори якої визначили антимікробну активність ПАР, синтезованих у середовищі з відходами виробництва біодизелю [53]. У роботі проводили порівняння активності рамноліпідвмісного супернатанту та екстрагованих ПАР у аналогічних концентраціях (3,9 г/л) на бактеріальні (*E.coli* MG 1655, *B. subtilis* MTCC 441, *B. subtilis* MTCC 121, *S. aureus* MTCC 737, *K. pneumoniae* MTCC 618, *Pseudomonas diminuta* AAU) та грибкові (*C. ablicans* MTCC 227, *Alternaria solani* AAU) тест-культури. Показано, що більш ефективним виявився розчин рамноліпідів – зони затримки тест-культур становили 10-17 мм, у той час як супернатант зумовлював зони затримки росту 7-10 мм.

Отже, інформації щодо антимікробної дії рамноліпідів, як і ліпопептидів, синтезованих на гліцерині, наведено вкрай мало, незважаючи на те, що МІК таких рамноліпідів були у діапазоні 0,125-433 мкг/мл, ці значення важко порівняти з літературними даними щодо антимікробної активності рамноліпідних ПАР, отриманих на інших субстратах (МІК 50-500 мкг/мл) [46]. Зазначимо, що з огляду на дані, представлені у вищеописаних статтях, рамноліпідні ПАР, синтезовані на гліцерині, не поступаються за своєю антимікробною дією ліпопептидам, отриманих у аналогічному середовищі.

Дані щодо біологічної активності мікробних ПАР, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення, наведено у табл. 1.2.

Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня

очищення

ПАР	Штам-продуцент	Концентрація гліцерину	Тест-культура	Антимікробна активність			Література
				МІК, мкг/мл	Зона затримки росту, мм	Інгібування росту	
Очищений гліцерин							
Ліпопептиди	<i>Bacillus circulans</i> (штам не вказано)	2%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> NCIM 2931	50	-	-	[38]
			<i>Micrococcus flavus</i> NCIM 2376	300			
			<i>Proteus vulgaris</i> NCIM 2857	50			
			<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	50			
			<i>Aspergillus niger</i>	200			
			<i>Candida albicans</i>	100			
	<i>Bacillus thuringiensis</i> pak2310	3%, об'ємна частка	<i>Fusarium oxysporum</i>	50	-	-	[38]
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> AR2	C:N=15,55	<i>Fusarium solani</i> ATCC 36031	500	-	-	[40]
			<i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 7229	500			
			<i>Alternaria alternata</i> MTCC 2724	750			
			<i>Alternaria citri</i> MTCC 4875	500			
			<i>Cladosporium cladosporoides</i> ATCC 16022	1000			
			<i>Scopulariopsis acremonium</i> ATCC 58636	250			
<i>Microsporum gypseum</i> MTCC 4522			250				
<i>Trichophyton rubrum</i> MTCC 296	1000						

Продовження таблиці 1.2

	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ST34	3%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> B170	-	18,3	-	[41]
			<i>Escherichia coli</i> H10407		17,7		
			<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		25,3		
			<i>Enterococcus faecalis</i> S1		18,7		
			<i>Enterococcus faecalis</i> S2		18,3		
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ST34	3%, об'ємна частка	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB 4	-	17,3	-	[42]
			<i>Escherichia coli</i> EC 5		17,7		
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP 1		14,3		
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA 3		13,3		
	<i>Streptomyces griseoplanus</i> NRRL-ISP5009	10 мл/л	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-543	-	25,1	-	[43]
			<i>Staphylococcus aureus</i> RCMB010010		26,07		
			<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		12,07		
			<i>Escherichia coli</i> ATCC25955		20,03		
			<i>Aspergillus fumigates</i> RCMB 002002		14,1		
			<i>Candida albicans</i> ATCC 10231		18,03		
	<i>Serratia marcescens</i> P1	10 мл/л	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S168	-	18	-	[44]
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA3		18		
			<i>Enterococcus faecalis</i> S1		18		
			<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932		24,7		
			<i>Candida albicans</i> ATCC 66027		25		

	<i>Serratia surfactantifaciens</i> sp. nov. YD25 ^T	Не зазначено	<i>Staphylococcus aureus</i> C3	-	11,2	-	[45]
			<i>Staphylococcus aureus</i> E1		11,2		
			<i>Staphylococcus aureus</i> E4		11,4		
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A62		14,4		
			<i>Rhodococcus rhodochrous</i> CGMCC 4.1815		12,5		
			<i>Micrococcus luteus</i> CGMCC 1.2299		19,4		
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas gessardii</i> M15	1%, об'ємна частка	<i>Staphylococcus aureus</i> 6538P	6,25	-	-	[47]
			<i>Bacillus cereus</i>	3,13			
			<i>Listeria monocytogenes</i>	3,13			
			<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,13			
			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 13637	3,13			
	<i>Halomonas elongata</i> BK-AG18	3%, об'ємна частка	<i>Staphylococcus aureus</i>	433	-	-	[48]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SS14	10% (об'ємна частка)	<i>Trichophyton rubrum</i>	0,5	-	-	[49]
			<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,125			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PNA1	1,5 %, об'ємна частка	<i>Pythium myriotylum</i>	-	-	4,5-10,2 см ²	[50]	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS9	2%, об'ємна частка	<i>Colletotrichum falcatum</i>	-	-	82,5%	[51]	

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ST5	3%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> ATCC 13706	-	29,3	-	[41]
			<i>Escherichia coli</i> ATCC 43892		22,7		
			<i>Escherichia coli</i> B170		20,3		
			<i>Escherichia coli</i> 3591-87		24,3		
			<i>Escherichia coli</i> K4CCA		17,7		
			<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		20,3		
			<i>Enterococcus faecalis</i> S2		21,7		
			<i>Bacillus cereus</i> ST18		22,3		
ПАР гліко-протеїнової природи	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> N2	9%, об'ємна частка	<i>Bacillus sp.</i> BC1	-	57,5	-	[52]
			<i>Escherichia coli</i> E2B		48,5		
			<i>Staphylococcus aureus</i> STP1		56,5		
	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> TM1		<i>Bacillus sp.</i> BC1		46,5		
			<i>Escherichia coli</i> E2B		33,5		
			<i>Staphylococcus aureus</i> STP1		36		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> G88		<i>Bacillus sp.</i> BC1		41		
			<i>Escherichia coli</i> E2B		19		
			<i>Staphylococcus aureus</i> STP1		36,5		
Відходи виробництва біодизелю							
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JBK1	3%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> MG 1655	-	14	-	[53]
			<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 441		12		
			<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 121		11		
			<i>Staphylococcus aureus</i> MTCC 737		17		
			<i>Klebsiella pneumoniae</i> MTCC 618		12		
			<i>Pseudomonas diminuta</i> AAU		10		
			<i>Candida ablicans</i> MTCC 227		12		
			<i>Alternaria solani</i> AAU		11		

Комплекс гліко- та аміноліпідів	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	5%, об'ємна частка	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	0,96	-	-	[55]
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	15,2			
			<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	3,8			
			<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	3,8			
			<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	7,6			
			<i>Candida albicans</i> Д-6	15,2			
			<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	7,6			
			<i>Candida utilis</i> ЕІ-8	7,6			
			<i>Aspergillus niger</i> Р-3	3,8			
			<i>Fusarium culmorum</i> Т-7	1,9			
Комплекс нейтральних, гліко- і аміноліпідів	<i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405	2%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	121	-	-	[56]
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	15			
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	15			
			<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	60			
			<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	15			
			<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	121			
			<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	121			
			<i>Erwinia aroideae</i> Н-3	60			
			<i>Candida albicans</i> Д-6	15			
			<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	30			
Комплекс нейтральних, гліко-, фосфо- і аміноліпідів	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017	2%, об'ємна частка	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	125	-	-	[57]
			<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	62,5			
			<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	31			
			<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	31			
			<i>Candida albicans</i> Д-6	250			
			<i>Candida utilis</i> ЕІ-8	125			
<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	62,5						

Отже, підсумована у табл. 1.2 інформація щодо антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих різними штатами продуцентів на відходах виробництва біодизелю, є небагаточисельною, але ці дані є багатообіцяючими, оскільки їх біологічна активність (мінімальні інгібуючі концентрації були у межах 0,96-250 мкг/мл) не поступається показникам антимікробної дії ПАР, синтезованих як на очищеному гліцерині (0,125-1000 мкг/мл), так і на інших субстратах (1-500 мкг/мл). Слід зазначити, що ефективність препаратів залежала від типу тест-культури. Разом з тим, об'єктивну оцінку та порівняння активності ПАР зробити важко, оскільки лише у частині вищенаведених робіт визначення антимікробної активності проводили за показником мінімальної інгібуючої концентрації, інші ж дослідники використовували метод дифузії в агар (діаметр зони затримки росту) або визначали ступінь інгібування росту тест-культур.

1.2.2. Антиадгезивна дія поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині

На відміну від значної кількості інформації, присвяченій антимікробній активності ПАР, синтезованих на гліцерині, відомостей про їх антиадгезивну дію налічується значно менше.

Так, Chebbi зі співавторами у роботі [54] встановили антиадгезивну дію рамноліпідів *P.aeruginosa* W10, синтезованих у середовищі з очищеним гліцерином (2%, об'ємна частка), щодо *Staphylococcus capitis* SH6 та *Bacillus lincheniformis* CAN55. Так, інгібування адгезії штаму SH6 до нержавіючої сталі було у межах 57-97% за концентрацій ПАР 0,78-25 мг/мл, у той час як пригнічення адгезії штаму CAN55 становило 78-93% за дії ПАР у концентрації 0,09-25 мкг/мл.

Окрім цього, упродовж останніх років дослідниками кафедри біотехнології та мікробіології у роботі [55] було встановлено порівняння біологічних властивостей (антимікробної та антиадгезивної активності, у тому числі й роль у руйнуванні біоплівки) поверхнево-активних речовин *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю. Так,

антимікробна активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, щодо бактеріальних (*B. subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини та спори), *Enterobacter cloacae* С-8, *E. coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1), дріжджових (*Candida albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2, *C. utilis* ЕІ-8) та грибних тест-культур (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7) була на кілька порядків нижчою – МІК були у діапазоні 0,96-15,2 мкг/мл, порівняно з показниками ПАР, отриманих у середовищі з очищеним гліцерином – 0,03-3,8 мкг/мл. Аналогічні закономірності спостерігали і при визначенні антиадгезивної активності таких ПАР. Так, адгезія вищезазначених тест-культур на абіотичних поверхнях (кахель, сталь, лінолеум), оброблених препаратами ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, була у 1,2-4 рази нижчою (34-87%), порівняно зі значеннями адгезії за дії поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині – 21-69%.

Також було встановлено залежність антимікробної та антиадгезивної активності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 від ступеня очищення гліцерину (очищений, відходи виробництва біодизелю), а також тривалості культивування продуцента на цих субстратах. МІК щодо досліджуваних тест-культур (*E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12, *S. aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E. cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3, *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2) ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю упродовж 5-и діб, становила 15–121 мкг/мл і була нижчою, ніж МІК ПАР, одержаних на очищеному субстраті (22,5–180 мкг/мл). Адгезія бактерій *E. coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2 (вегетативних клітин та спор) та дріжджів *Candida albicans* Д-6 на абіотичних поверхнях, оброблених ПАР, синтезованими на відходах виробництва біодизелю упродовж як 5-и, так і 7-и діб, була у середньому на 11–12 % нижчою (16-46%), ніж після обробки матеріалів ПАР, отриманими на очищеному субстраті – 33-66%. Автори припустили, що при культивуванні продуцента у середовищі з промисловими відходами вміст синтезованих аміноліпідів був вищим, ніж при використанні очищеного гліцерину, а оскільки аміноліпіди відповідальні за антимікробну

активність ПАР, то це і обумовлює вищезазначену ефективність використання такого субстрату [56].

У іншій роботі цими ж дослідниками було визначено антимікробну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *R.erythropolis* ІМВ Ас-5017 на відходах виробництва біодизелю та відпрацьованій соняшниковій олії. Встановлено, що заміна очищеного гліцерину та рафінованої олії на відповідні промислові відходи супроводжувалася підвищенням як концентрації синтезованих штамом ІМВ Ас-5017 ПАР, так і їхньої антибактеріальної та антифунгальної активності. Мінімальні інгібуючі концентрації щодо бактеріальних (*E.coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *S. aureus* БМС-1) і дріжджових (*C. albicans* Д-6, *C.utilis* БВС-65, *C. tropicalis* РЕ-2) тест-культур поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю та відпрацьованій олії, перебували в межах 20-250 мкг/мл і були у 2-4 рази нижчими порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на відповідних очищених субстратах – 62,5-500 мкг/мл [57].

Отже, поверхнево-активні речовини, синтезовані різними мікроорганізмами на гліцерині різного ступеня очищення, проявляють не менш ефективну антиадгезивну дію щодо деяких мікроорганізмів (пригнічення адгезії на 21-93%), у порівнянні з ПАР, отриманими на інших субстратах – так, згідно літературних даних [58-59], значення інгібування адгезії різних тест-культур за дії трегалозоліпідів, синтезованих представниками роду *Rhodococcus* на гексадекані, було у межах 10-95%.

Таким чином, підсумувавши всю вищенаведену інформацію щодо синтезу та біологічної активності поверхнево-активних речовин на гліцерині різного ступеня очищення, можна зробити висновок про те, що відомості хоч і небагаточисельні, однак вони засвідчують можливість використання відходів виробництва біодизелю для мікробного синтезу практично цінних речовин з досить високою біологічною активністю, що дасть змогу не тільки підвищити економічність виробництва, але і разом з тим утилізувати такі промислові відходи.

1.3. Перспективи практичного використання поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення

Утилізація ксенобіотиків є гострою проблемою у сучасному світі. Раніше було показано, що серед методів деструкції нафтових та інших забруднень перспективним є використання мікроорганізмів, що здатні до споживання вуглеводнів нафти як єдиного джерела вуглецю. Разом з тим, застосування мікроорганізмів, здатних до синтезу таких практично цінних метаболітів як поверхнево-активні речовини, є економічно та екологічно вигідним альтернативним підходом до вирішення даної проблеми. Встановлено, що мікробні ПАР здатні знижувати поверхневий натяг та посилювати емульгування на межі поверхонь системи вода-олія, що відповідно супроводжувалось підвищенням засвоюваності субстратів, в результаті чого підвищувалась здатність таких сполук розкладати ксенобіотики [60].

Згідно літературних даних, поверхнево-активні речовини, синтезовані на гліцерині різного ступеня очищення, мають ряд властивостей, зокрема вони проявляють здатність до деструкції ксенобіотиків [61-62], окрім цього вони є ефективними емульгувальними агентами [6, 16, 26, 28, 62, 64-70], а також здатні до усунування нафти із забруднених ґрунтів [68-70].

Розкладання ксенобіотиків. Здатність ліпопептидів, синтезованих *Halomonas pacifica* Spahr3 у середовищі з гліцерином (1%, об'ємна частка) розкладати відпрацьовану моторну оливу визначили дослідники у статті [61]. Так, за початкової концентрації моторної оливи 20% (об'ємна частка) при дії ліпопептидвмісного супернатанту (0,75 г/л) протягом 24 год ефективність розкладання ксенобіотика була у 4,7 вищою, порівняно з дією синтетичних ПАР та контрольним зразком (вода). Слід зазначити, що авторами не було наведено ступеня розкладання ксенобіотика, а лише вказано, у скільки разів він був ефективніший, порівняно з іншими зразками.

Інші дослідники [62] також встановили здатність ліпопептидних ПАР, отриманих після культивування *Paenibacillus* sp. D9 на гліцерині (2%, об'ємна частка), до деструкції ксенобіотиків. Початкова концентрація суміші аліфатичних

вуглеводнів (*n*-додекан, *n*-гексадекан, дизельне паливо) становила 10% (об'ємна частка), визначення деструкції проводили протягом 7 діб за різних концентрацій ПАР – 100-500 мг/л. Показано, що зі збільшенням концентрації ПАР ступінь розкладання вуглеводнів відповідно теж збільшувався з 49,1 до 65,1%. Дані результати було порівняно з дією синтетичного препарату ПАР додецилсульфату натрію (SDS). Встановлено, що застосування SDS супроводжувалось нижчими показниками деструкції ксенобіотиків, зокрема, зі збільшенням концентрації SDS ступінь розкладання зменшився з 42,4 до 19,2%. Разом з тим, автори повідомили, що з огляду на властивості ліпопептидних ПАР штаму D9, їх застосування у біоремедіаційних процесах є багатообіцяючим, адже мікробні ПАР є абсолютно безпечними для навколишнього середовища.

Утворення емульсій. Згідно літературних відомостей, мікробні ПАР є ключовими факторами у підході мікробологічного посилення процесів нафтовіддачі (MEOR) та біоремедіації нафтових забруднень завдяки їх здатності до утворення емульсій з нафтою та іншими вуглеводнями [63].

Так, Jimoh зі співавторами у роботі [62] повідомили, що ліпопептидам штаму *Paenibacillus* sp. D9 окрім здатності до розкладу ксенобіотиків притаманні і емульгувальні властивості. Емульгувальну дію ліпопептидвмісного супернатанту (4,1 г/л) визначали за індексом емульгування (E_{24}), співвідношення супернатанту та гексадекану становило 1:1 (по 2 мл), так після 24 год інкубації значення E_{24} досягнуло 85%.

Автори статті [64] провели визначення властивостей маннозилеритритол(MEL)-ліпідів за вирощування *Pseudozyma antarctica* JCM10317 у середовищі з гліцерином як субстратом (10%, об'ємна частка). Після 8 год інкубації MEL-ліпідів у концентрації 1% (об'ємна частка) емульгували парафінову олію на 25% за однакових співвідношень розчину ПАР та олії (1:1).

Sousa зі співавторами встановили здатність ліпопептидних ПАР, синтезованих *B. subtilis* LAMI005 та *B. subtilis* LAMI009 у середовищі з гліцерином (2%, об'ємна частка), до утворення емульсій з гідрофобними сполуками [65]. Для встановлення емульгувальної здатності використовували

супернатанти, отримані після культивування штамів LAMI005 та LAMI009, у складі яких містилось 441,06 та 267,56 мг/л сурфактину відповідно, при цьому співвідношення ліпопептидвмісного супернатанту та гідрофобних речовин (*n*-гексадекан, соєва олія, гас) становило 2:1. Емульгувальну здатність вимірювали у одиницях емульгувальної активності (U), одна одиниця була визначена як кількість ПАР, що змінила поглинання емульсії на 1,0. Так, за дії супернатанту штаму LAMI005 протягом 50 хв спостерігали вищу здатність до утворення емульсій з гексадеканом, соєвою олією та гасом – 0,95-1,4 U, порівняно з дією супернатанту штаму LAMI009 – 0,2-0,9 U.

Аналогічну властивість було виявлено і для рамноліпідів, отриманих після культивування *P. aeruginosa-estA* у середовищі з відходами виробництва біодизелю (58,9 г/л) [6]. Так, за дії рамноліпідвмісного супернатанту (1,28 г/л) при співвідношенні супернатанту та олій для емульгування 1:1 індекс емульгування E₂₄ соняшникової, соєвої, мінеральної, кукурудзяної, канолової олії та трибутирину становив в середньому 65,5%.

Властивості рамноліпідів, отриманих після культивування *Pseudomonas aeruginosa* TGC01 у середовищі з відходами виробництва біодизелю (40 г/л), описали Bezerra зі співавторами [28]. Визначення здатності до утворення емульсій проводили за співвідношення супернатанту та вуглеводнів 1:1. Встановлено, що за дії супернатанту з концентрацією ПАР 11 г/л індекс емульгування дизельної оливи, бензину та мастила був у діапазоні 34,6-54,2 %, у той час як застосування рамноліпідвмісної культуральної рідини супроводжувалось дещо нижчими показниками емульгування – 35-45,8%.

Автори статті [26] також повідомили про емульгувальні властивості поверхнево-активних рамноліпідів у складі супернатанту, отриманого після культивування *P. aeruginosa* UCP0992 на очищеному гліцерині (2%, об'ємна частка). Показано, що індекс емульгування E₂₄ бавовняної, кукурудзяної, рисової, соєвої олії, гексадекану, бензолу, моторної оливи, дизелю був у діапазоні 40,5-75,2%, а найвищі показники спостерігали у разі використання нафти як субстрату для емульгування – E₂₄ становив 100%. При цьому супернатант та гідрофобні

субстрати використовували у пропорції 1:1, концентрація ПАР у супернатанті становила 8 г/л.

Інші дослідники [66] встановили емульгувальну активність рамноліпідів, синтезованих штамом *P. aeruginosa* RG18 у гліцеринвмісному середовищі (40 г/л). Для проведення визначення розчин ПАР (1 мг/л) та субстрати для емульгування було взято в однакових кількостях (1:1). Так, коефіцієнт емульгування E_{24} гексану, оливкової олії, циклогексану, толуолу та ксилолу був у межах 50-70%.

Порівняння властивостей рамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* SG в аеробних та анаеробних умовах культивування за наявності гліцерину (70,3 г/л) провели автори статті [16]. Дослідники зазначили, що хоч і кількість отриманих в анаеробних умовах рамноліпідів була меншою, проте емульгувальна здатність виявилась вищою. Так, за однакової концентрації розчинів ПАР (1000 мг/л), отриманих в аеробних та анаеробних умовах, та співвідношення розчину рамноліпідів і гідрофобного субстрату (1:1) індекси емульгування нафти становили 63,3 та 80,3% відповідно.

У статті [67] також повідомили про емульгувальні властивості рамноліпідних ПАР *P. aeruginosa* P6. При дії рамноліпідвмісного супернатанту (концентрацію не вказано) та їх співвідношення з гідрофобним субстратом 1:1 значення індексу емульгування гексадекану становило 63,3%.

Здатність до утворення емульсій ліпопептидними ПАР *B. nealsonii* S2MT за їх культивування на гліцерині (2%, об'ємна частка) визначили автори роботи [68]. За присутності супернатанту у концентрації 1,3 г/л та його співвідношенні з гасом 1:1 індекс емульгування E_{24} гасу становив 55%.

Перспективи використання ліпопептидів *Brevibacterium luteolum* BS, вирощених у гліцеринвмісному середовищі (2%, об'ємна частка), у процесах біоремедіації наведено у роботі [69]. Визначення здатності до утворення емульсій проводили за концентрації ПАР 0,1% (об'ємна частка), співвідношення розчину ПАР та субстрату для емульгування становило 2:3. Встановлено, що індекс емульгування E_{24} таких вуглеводнів як гексадекан, мінеральна олія, декан, гас, тваринний жир та соєва олія був у межах 60-79,3%.

Подібні властивості рамноліпідних ПАР, синтезованих *P. aeruginosa* УМ4 у гліцеринвмісному середовищі (30 г/л), встановили і Лі зі співавторами [70]. Так, встановлення здатності до утворення емульсій проводили за концентрації ПАР 500 мг/л і співвідношення розчину рамноліпідів та вуглеводнів 1:1. Показано, що індекс емульгування E_{24} рідкого парафіну, гасу та n-гексану був у діапазоні 56-60%.

Відмивання нафти з піску. У наступних роботах [68-70] окрім емульгувальних властивостей дослідники встановили і здатність ПАР, отриманих на гліцерині, відмивати нафту із забруднених зразків ґрунту та піску.

Так, у роботі [68] було встановлено можливість очищення забрудненого нафтою ґрунту під дією ПАР *B. nealsonii* S2MT. Початкова концентрація нафти становила 10% (об'ємна частка), а концентрація препаратів ПАР – 10 та 40 мг/л. Показано, що після 24 год ступінь відмивання нафти із забрудненого зразка був 43,6 та 46,7% відповідно, у той час як при дії ПАР синтетичного походження (додецилсульфат натрію) у аналогічних концентраціях зафіксували нижчі показники – 39,4 та 45,3% відповідно.

Здатність ліпопептидів *B. luteolum* BS відмивати нафту зі зразків забрудненого піску досліджували і автори статті [69]. Так, промивання піску, що містив 10% (об'ємна частка) нафти, розчином ПАР у концентрації 0,1% (об'ємна частка) здійснювали протягом 6 год, при цьому ступінь відмивання становив 83%. Автори зазначили, що такі результати свідчать про можливість використання розчину ліпопептидів штаму BS у біоремедіаційних процесах.

Аналогічне визначення провели інші дослідники у роботі [70]. Дослідження відмивання нафти з піску проводили протягом 24 год за початкової кількості нафти 2,2% (об'ємна частка), концентрація розчину ПАР *P. aeruginosa* УМ4 становила 1000 мг/л, а виділених ди-рамноліпідів 500 мг/л. Показано, що за дії розчину ПАР та виділених ди-рамноліпідів (500 мг/л) ступінь відмивання нафти у забруднених зразках піску становив 99,3 та 82,5%, що майже у 3 рази вище, порівняно з показниками дії синтетичної поверхнево-активної речовини SDS –

38,7 та 25% відповідно. Такі результати засвідчують можливість успішного використання мікробних ПАР для збільшення обсягів нафтовіддачі.

Отже, незважаючи на те, що інформації про фізико-хімічні властивості та практичне використання мікробних поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення, у сучасній літературі представлено небагато, завдяки своїм властивостям такі поверхнево-активні речовини є не менш ефективними емульгувальними агентами і деструкторами нафтових та інших забруднень, порівняно з їх синтетичними аналогами.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти досліджень

Основним об'єктом досліджень даної кваліфікаційної роботи був штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, виділений із забрудненого нафтою зразка ґрунту. Штам К-4 було зареєстровано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7241. Встановлено, що позаклітинні ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за своєю хімічною природою є комплексом гліко- (трегалозомоно- і диміколати, трегалозомоно- і диацелати) та аміноліпідів [71].

При визначенні антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, а також їх здатності до деструкції біоплівки, як тест-культури використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

2.2. Умови культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 проводили у мінеральному базовому середовищі наступного 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. Середовище збагачене дріжджовим автолізатом – 0,5% (об'ємна частка), та розчином мікроелементів – 0,1% (об'ємна частка), що складається з (г/100мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 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; EDTA – 0,5.

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Матеріали і методи досліджень	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Ярова Г.А.					42	6
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

Як джерела вуглецю (субстрати) використовували очищений гліцерин – 3% та відходи виробництва біодизелю – 5% (об'ємна частка). Концентрації гліцерину різного ступеня очищення еквімолярні за вуглецем.

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі росту, вирощену у середовищі вищезазначеного складу з 0,5% відповідного субстрату. Інокулянт вносили у кількості 10% від об'єму середовища, чисельність бактерій складала $10^4 - 10^5$ кл/мл.

Особливості культивування у середовищі з катіонами кальцію

Модифіковане середовище 1: у базове середовище додатково вносили 0,1 г/л CaCl_2 .

Модифіковане середовище 2: у базове середовище додатково вносили 0,2 г/л CaCl_2 .

Особливості культивування за наявності у середовищі біологічних індукторів

Як біологічний індуктор використовували бактеріальний штам *Bacillus subtilis* БТ-2, який вносили у вигляді суспензії живих та інактивованих клітин, а також у вигляді супернатанту в середовище культивування продуцента ПАР. Внесення індуктора здійснювали на початку процесу культивування. *Bacillus subtilis* БТ-2, вирощений на МПА упродовж 24 год, суспендували в 100 мл стерильної водопровідної води і вносили 2,5 мл суспензії на 100 мл середовища культивування продуцента ПАР. Інактивовані стерилізацією в автоклаві при 131°C протягом 1 год клітини індуктора вносили з розрахунку 10 мл суспензії на 100 мл поживного середовища. Супернатант вносили у кількості 2,5 мл на 100 мл середовища культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Культивування штамів проводили в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці за 320 об/хв при 30 °C упродовж 7 діб зважаючи на достатньо високу концентрацію субстратів.

2.3. Одержання безклітинних екстрактів

Для отримання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, центрифугували при 5000 g та

4°C протягом 20 хв. Отриманий після центрифугування осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М К⁺-фосфатним буфером (рН 7.0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М К⁺-фосфатному буфері (рН 7.0) і руйнували ультразвуком при 22 кГц 3 рази по 40 с при 4 °С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 °С), осад відкидали, надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

2.4. Визначення НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогеназної активності

НАДФ⁺-залежну (КФ 1.4.1.4) глутаматдегідрогеназну активність аналізували за утворенням глутамату під час окиснення НАД і НАДФН при 340 нм [72]. Під час дослідження впливу катіонів на активність глутаматдегідрогенази в реакційну суміш вносили 0,001 і 0,005 мМ Zn²⁺, 1–10 мМ Ca²⁺, 5 і 10 мМ Mg²⁺, 25–100 мМ Na⁺, K⁺ у вигляді розчинів солей ZnSO₄·7H₂O, CaCl₂, MgSO₄·7H₂O, NaCl і KCl відповідно.

Активність ферменту виражали в нмоль отриманого за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Визначення вмісту білка у безклітинних екстрактах здійснювали за Bradford [73]. Глутаматдегідрогеназну активність аналізували при температурі 28–30 °С, що є оптимальною для росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

2.5. Визначення концентрації поверхнево-активних речовин і одержання препаратів ПАР

Кількість позаклітинних ПАР визначали з використанням модифікованого нами методу Блайя і Дайєра [74] після екстракції їх сумішшю хлороформу і метанолу у пропорції 2:1 з супернатанту культуральної рідини, який одержували центрифугуванням при 5000 g протягом 20 хв.

Зважаючи на те, що *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а відомий метод Блайя і Дайєра [74], використовуваний для виділення ПАР, дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, було проведено модифікацію класичної системи розчинників (суміш Фолча) шляхом додавання 1 М HCl (хлороформ – метанол – вода = 4:3:2).

Отримана система дозволяє в повній мірі виділяти як полярні, так і неполярні ліпіди.

У циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл поміщали 25 мл супернатанту, додавали 1 н розчин HCl для досягнення рН 4,0–4,5 (близько 5 мл), воронку закривали шліфованої пробкою і струшували 3 хв, потім додавали 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хв. Одержану після екстракції суміш залишали в ділильній воронці для поділу фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 1 н розчин HCl для досягнення рН 4,0–4,5 (близько 5 мл), 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і екстрагували ліпіди протягом 5 хв. Після поділу фаз зливали нижню фракцію, отримуючи органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднували і упарювали на роторному випарнику IP-1M2 при 50 °C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

У дослідженні як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 різної концентрації (0,7–355 мкг/мл). 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 температурі 112 °C протягом 30 хв.

2.6. Дослідження антимікробної активності ПАР

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [75]. Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти

пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл (МПБ чи сусло і розчин поверхнево-активних речовин), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці зменшувалась удвічі. Як контроль використовували 1 мл МПБ (для бактерій) або сусла (для дріжджів) без додавання розчину ПАР. Далі у кожному з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 – 10^6 КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28–30 °С для бактерій та 24–26 °С для дріжджів. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було, що свідчить про відсутність росту. Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

2.7. Визначення антиадгезивної активності ПАР

Антиадгезивну активність ПАР визначали як описано у роботі [76]. Однакові пластинки (1 см²) досліджуваних матеріалів попередньо очищали мийним засобом, ополіскували дистильованою водою, висушували на повітрі та стерилізували за відповідних режимів (стальні пластини, кахель – при 121 °С, пластик, лінолеум – при 112°С упродовж 30 хв). Після стерилізації пластини обробляли розчином ПАР (у контрольному варіанті – стерильним фосфатним буфером) та витримували при 30°С протягом 18–24 год. Далі контрольні і попередньо оброблені препаратами ПАР матеріали ополіскували стерильним фосфатним буфером або дистильованою водою для видалення залишку препаратів.

Тест-культури мікроорганізмів суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені і не оброблені (контрольні) матеріали і витримували 2 год при 30 °С. Контрольні і попередньо оброблені матеріали ополіскували фосфатним буфером, щоб змити неадгезовані клітини. Матеріали з прикріпленими на них клітинами залишали до висихання на повітрі, після чого прикріплені клітини фіксували, поміщаючи матеріал спочатку у метанол (99 %) на 15 хв і фарбували у 1 % розчині генціанвіолету протягом 5 хв. Пластини матеріалу ополіскували водопровідною водою і залишали при кімнатній

температурі до висихання. Далі адгезовані клітини з барвником змивали з поверхні матеріалів 1 мл льодової оцтової кислоти, вносили 9 мл дистильованої води і вимірювали оптичну густину отриманої суспензії на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 540 нм.

Кількість адгезованих клітин визначали як відношення оптичної густини суспензії, отриманої після оброблення матеріалів препаратами ПАР, до оптичної густини суспензії, отриманої після оброблення матеріалів фосфатним буфером (контроль), і виражали у відсотках.

2.8. Дослідження ступеня деструкції біоплівки за дії ПАР

Визначення впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали як описано у роботі [77]. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл МПБ чи рідкого суслу та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ чи суслу і 20 мкл суспензії тест-культури та інкубували протягом наступних 24 год. Через 48 год культуральну рідину зливали, а в лунки мікропланшета з попередньо сформованою на них біоплівкою тест-культури вносили по 200 мкл препаратів ПАР різної концентрації. У контрольні лунки замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду у кількості 200 мкл. Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і спектрофотометрично визначали кількість адгезованих клітин. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано раніше [78, 79]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

**РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КАТІОНІВ КАЛЬЦІУ НА БІОЛОГІЧНУ
АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER
CALCOACETICUS* IMB B-7241**

**3.1. Вплив катіонів кальцію на активність НАДФ⁺-залежної
глутаматдегідрогеназної активності у *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241**

Відомо, що глутаматдегідрогеназа здійснює відновлювальне амінування 2-оксоглутарату з утворенням глутамату – донора аміногруп у подальшому біосинтезі аміноліпідів [72]. Тобто, чим вища активність цього ферменту в клітинах продуцентів поверхнево-активних речовин, тим вищий вміст у складі комплексу ПАР аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність отриманих поверхнево-активних речовин.

Дані, представлені у *табл. 3.1*, засвідчують, що при додатковому внесенні катіонів кальцію у середовище культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з очищеним гліцерином активність НАДФ⁺-глутаматдегідрогенази підвищувалася майже в 2,5–3 рази порівняно з показниками активності, зафіксованими при вирощуванні продуцента на базовому середовищі. Однак, при додаванні CaCl₂ у середовище з відходами виробництва біодизелю НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність залишалася практично такою ж, як і при культивуванні штаму IMB B-7241 на базовому середовищі.

Таким чином, отримані результати засвідчують можливість регуляції активності НАДФ⁺-глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу поверхнево-активних речовин штаму IMB B-7241, внаслідок модифікації складу поживного середовища зміною в ньому концентрації активаторів цього ферменту. На основі отриманих даних можна зробити припущення, що додаткове внесення CaCl₂ у середовище з гліцерином різного ступеня очищення для культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 буде супроводжуватися синтезом ПАР з підвищеною антимікробною та антиадгезивною активністю.

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярова Г.А.			Розділ 3. Вплив катіонів кальцію на біологічну активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пирог Т.П.					48	18
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

**НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність при культивуванні
A. calcoaceticus ІМВ В-7241 з різним вмістом катіонів кальцію**

Ростовий субстрат	Середовище культивування	НАДФ⁺-глутамат-дегідрогеназна активність (нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білку)
Очищений гліцерин	Базове	159±8
	+ 0,1 г/л CaCl ₂	401±20
	+ 0,2 г/л CaCl ₂	476±24
Відходи виробництва біодизелю	Базове	526±26
	+ 0,1 г/л CaCl ₂	541±27
	+ 0,2 г/л CaCl ₂	541±27

3.2. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності різних концентрацій катіонів кальцію

У зв'язку з припущенням, що додаткове внесення CaCl₂ у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 буде супроводжуватися синтезом ПАР з підвищеною біологічною активністю, на наступному етапі встановлювали можливість регуляції антимікробної активності ПАР штаму ІМВ В-7241 зміною у складі середовища з гліцирином різного ступеня очищення вмісту катіонів кальцію.

Так, у *табл. 3.2* наведено дані щодо антимікробної активності поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі з різними концентраціями хлориду кальцію.

Результати досліджень показали, що культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з очищеним гліцирином та різними концентраціями CaCl₂ супроводжувалось синтезом ПАР з підвищеною антимікробною активністю. Так, мінімальні інгібуючі концентрації таких ПАР були у 1,8-57 разів нижчими (1,01-21,3 мкг/мл), порівняно з МІК ПАР, отриманих у базовому середовищі – 1,83-58,8 мкг/мл.

Разом з тим, дані наведені у *табл. 3.2* засвідчують, що антимікробна активність ПАР, отриманих за наявності 0,1 г/л CaCl₂ у середовищі з відходами виробництва біодизелю була нижчою, ніж поверхнево-активних речовин,

синтезованих у базовому середовищі (МІК щодо досліджуваних тест-культур становили 44,4-355 і 29,7-59,5 мкг/мл відповідно). На нашу думку, однією з причин дещо нижчої антимікробної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, є наявність у їх складі катіонів калію та натрію, які можуть бути потенційними інгібіторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

У той же час внесення 0,2 г/л хлориду кальцію у середовище з відходами виробництва біодизелю супроводжувалося утворенням ПАР з вищою антимікробною активністю порівняно з препаратами, синтезованими на середовищі з 0,1 г/л CaCl₂ (14,7-29,4 і 44,4-355 мкг/мл відповідно, див. *табл. 2*). Крім того, мінімальні інгібуючі концентрації щодо *Bacillus subtilis* БТ-2 та *Enterobacter cloacae* С-8 поверхнево-активних речовин, синтезованих за наявності 0,2 г/л хлориду кальцію, не відрізнялися від показників, встановлених для ПАР, одержаних на базовому середовищі з відходами виробництва біодизелю (29,4-29,7 мкг/мл), а МІК щодо *Staphylococcus aureus* БМС-1 і *Candida albicans* Д-6 таких ПАР були навіть у 4 рази нижчими, ніж МІК препаратів, синтезованих у базовому середовищі (14,7 і 59,5 мкг/мл відповідно) (*табл. 3.2*).

Виявлена залежність антимікробної активності ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, від концентрації катіонів кальцію у середовищі може бути зумовлена такими причинами. По-перше, з врахуванням наявності у складі відходів виробництва біодизелю одновалентних катіонів - потенційних інгібіторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази - для активації цього ферменту може бути потрібна вища концентрація катіонів кальцію. По-друге, цілком ймовірно, що у штаму ІМВ В-7241 є кілька глутаматдегідрогеназ, які активуються різними концентраціями катіонів кальцію.

Попередні дослідження науковців кафедри біотехнології і мікробіології [3] були присвячені встановленню впливу різних концентрацій катіонів кальцію на антимікробну активність ПАР, синтезованих під час вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі з етанолом. Результати досліджень показали, що мінімальна інгібуюча концентрація щодо усіх досліджуваних бактерій

(*Escherichia coli* ІЕМ-1, *B. subtilis* БТ-2, *E. cloacae* С-8, *Proteus vulgaris* ПА-12), за винятком *S. aureus* БМС-1, поверхнево-активних речовин, утворених на середовищі з 0,1 г/л CaCl₂, була в 1,3–3,5 рази нижчою (4-32 мкг/мл), ніж МІК поверхнево-активних речовин, синтезованих на базовому середовищі – 14-56 мкг/мл. Отримані дані свідчать про те, що додаткове внесення катіонів кальцію у середовище з етанолом спричинило підвищення антимікробної активності ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Незважаючи на те, що поверхнево-активні речовини представників роду *Acinetobacter* володіють спектром біологічних властивостей, серед яких і антимікробна активність, у доступній літературі відомості про антимікробну дію таких ПАР за культивування продуцентів у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення є обмеженими, однак з кожним роком з'являється все більша кількість робіт, присвячених дослідженню антимікробної активності як ліпопептидних, так і гліколіпідних ПАР, синтезованих у гліцеринвмісному середовищі іншими продуцентами.

Так, в ході проведення порівняння отриманих нами даних з відомостями щодо ефективності ліпопептидів, отриманих у гліцеринвмісному середовищі, встановили, що ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 мають вищу антимікробну активність. У статтях [38-40] показано, що ліпопептиди, синтезовані *Bacillus circulans*, *Bacillus thuringiensis* pak2310 та *Bacillus amylofaciens* AR2 за наявності 2%, 3% (об'ємна частка) та 62 г/л гліцерину відповідно, виявились ефективними щодо деяких бактеріальних (*E. coli* NCIM 2931, *Micrococcus flavus* NCIM 2376, *P. vulgaris* NCIM 2857 та *S. aureus* MRS) та грибних (*Aspergillus niger*, *C. albicans*, *Fusarium solani* ATCC 36031, *Fusarium oxysporum* MTCC 7229, *Alternaria alternata* MTCC 2724, *Alternaria citri* MTCC 4875, *Cladosporium cladosporoides* ATCC 16022, *Scopulariopsis acremonium* ATCC 58636, *Microsporium gypseum* MTCC 4522, *Trichophyton rubrum* MTCC 296) тест-культур у високих концентраціях – МІК становили 50-300, 50 та 125-750 мкг/мл відповідно. У свою чергу, ПАР штаму *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як за вирощування продуцента на очищеному гліцерині, так і за використання відходів виробництва біодизелю як субстрату, з додаванням

катіонів кальцію, проявляли антимікробну активність щодо тест-культур бактеріального та дріжджового походження у 3-50 разів менших концентраціях – 1,01-21,3 та 14,7-29,4 мкг/мл відповідно.

Окрім цього, у літературі представлено і відомості про рамноліпіди, отримані у середовищі з гліцерином, антимікробну активність яких визначали також за показником мінімальної інгібуючої концентрації [47-49]. Так, рамноліпідні ПАР, отримані при культивуванні *Pseudomonas gessardii* M15, *Halomonas elongata* BK-AG18 та *Pseudomonas aeruginosa* SS14 за наявності різних концентрацій гліцерину (1, 3 та 10%, об'ємна частка відповідно) проявляли антимікробну активність щодо бактеріальних (*S. aureus* 6538P, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stenotrophomonas maltophilia* 13637) та грибних (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*) тест-культур у діапазоні мінімальних інгібуючих концентрацій 3,13-433 мкг/мл. Отже, літературні дані свідчать про те, що антимікробна активність таких рамноліпідів [47-49] є нижчою, у порівнянні з нашими показниками антимікробної дії поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих за наявності у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення катіонів кальцію – МІК були нижчими у 3-15 разів (1,01-29,4 мкг/мл).

Варто зазначити, що автори робіт [41-53] при визначенні антимікробної активності ПАР, синтезованих *B. amyloliquefaciens* ST34, *P. aeruginosa* ST5, *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP5009, *Serratia marcescens* P1, *Serratia surfactantfaciens* sp. nov. YD25^T, *P. aeruginosa* DS9 та представниками роду *Lactobacillus* (*L. delbrueckii* N2, *L. cellobiosus* TM1 та *L. plantarum* G88) у гліцеринвмісному середовищі, використовували інші методи визначення антимікробної активності, зокрема метод дифузії в агар та метод інгібування росту, тому такі відомості не можемо порівняти з нашими даними щодо активності ПАР штаму *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Таким чином, дані представлені у табл. 3.2 свідчать про можливість підвищення антимікробної активності ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 внаслідок внесення у середовище з гліцерином різного ступеня очищення катіонів кальцію.

Антимікробна активність ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію

Джерело вуглецю	Концентрація CaCl ₂ (г/л)	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо			
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Candida albicans</i> Д-6
Відходи виробництва біодизелю (5%)	0	29,7	29,7	59,5	59,5
	0,1	88,7	44,4	88,7	355
	0,2	29,4	29,4	14,7	14,7
Очищений гліцерин (3%)	0	3,67	1,83	58,8	29,4
	0,1	2,65	1,33	21,3	21,3
	0,2	1,01	1,01	2,03	4,06

Примітка. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, синтезованих у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без CaCl₂).

3.3. Вплив катіонів кальцію на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин

Окрім ряду інших різноманітних властивостей, поверхнево-активним речовинам штаму ІМВ В-7241 притаманна і антиадгезивна активність. Зважаючи на це, після дослідження антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 було проведено визначення антиадгезивної здатності ПАР, синтезованих за наявності у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення катіонів кальцію.

Дані, представлені у *табл. 3.3 і 3.4*, свідчать про те, що додаткове внесення в середовище з очищеним гліцерином катіонів кальцію супроводжувалось синтезом ПАР з дещо підвищеною антиадгезивною активністю. Так, за дії ПАР, синтезованих у такому середовищі, адгезія на абіотичних матеріалах *S. aureus* БМС-1 становила 3-28% і була нижчою порівняно з показниками за наявності ПАР, утворених у середовищі без катіонів кальцію – 11-33% (*табл. 3.3*). Схожі закономірності спостерігалися у разі антиадгезивної активності ПАР щодо *V. subtilis* БТ-2 (*табл. 3.4*). Адгезія клітин цієї тест-культури на абіотичних поверхнях, оброблених розчинами поверхнево-активних, синтезованих у середовищі з хлоридом кальцію, становила 26-45 %, що нижче, ніж після обробки ПАР, одержаними на базовому середовищі (31-48 %). У той же час кількість прикріплених до поверхонь клітин *E. cloacae* С-8 знижувалася (порівняно з контролем) на кілька відсотків тільки у разі їх обробки ПАР, синтезованими за наявності у середовищі 0,2 г/л, а адгезія *C. albicans* Д-6 була практично однаковою після обробки усіма досліджуваними ПАР (див. *табл. 3.4*).

Крім того, внесення 0,2 г/л CaCl_2 у середовище з відходами виробництва біодизелю також супроводжувалось синтезом ПАР, за наявності яких адгезія *S. aureus* БМС-1 на кахелі, сталі та склі становила всього 7-25%, у той час як антиадгезивна активність ПАР, синтезованих у середовищі без катіонів кальцію, була нижчою – ступінь адгезії становив 10-64% (*табл. 3.3*). Зазначимо, що отримані дані щодо антиадгезивної дії ПАР штаму ІМВ В-7241, отриманих за наявності 0,2 г/л хлориду кальцію, щодо *S. aureus* БМС-1 корелюють із

результатами антимікробної активності таких ПАР (див. *табл. 3.2*), оскільки як відомо в основі антиадгезивної дії ПАР лежить їх антимікробна активність, відповідно причини впливу концентрації хлориду кальцію у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на такі властивості отриманих ПАР є аналогічними.

Разом з тим дані, наведені у *табл. 3.5*, свідчать про те, що наявність CaCl_2 у середовищі з відходами виробництва біодизелю не впливала позитивно на антиадгезивні властивості синтезованих ПАР щодо інших тест-культур (*B. subtilis* БТ-2, *E. cloacae* С-8 та *C. albicans* Д-6). Лише за найнижчої концентрації ПАР (0,55 мкг/мл), синтезованих за наявності у середовищі 0,2 г/л хлориду кальцію, спостерігали зниження на 18 % адгезії *C. albicans* Д-6 на сталі у порівнянні з показниками антиадгезивної активності ПАР, отриманих у базовому середовищі.

Зазначимо, що дані, наведені у *табл. 3.3-3.5*, свідчать про те, що антиадгезивна активність ПАР залежить від багатьох чинників: концентрації ПАР, типу абіотичної поверхні і типу тест-культур. Крім того, не виявлено прямої кореляції між антимікробною та антиадгезивною активністю ПАР, синтезованих в різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (див. *табл. 3.2 і 3.3-3.5*). Це може свідчити про те, що в основі антиадгезивної дії мікробних поверхнево-активних речовин лежить не тільки антимікробна активність, а й інші механізми (наприклад, зміна поверхневого заряду клітин чи поверхні).

Упродовж останніх років дослідниками кафедри біотехнології та мікробіології у роботі [3] було описано результати дослідження антиадгезивних властивостей поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, одержаних за наявності у середовищі з етанолом різних концентрацій катіонів кальцію. У цьому експерименті використовували розчини ПАР з базовою концентрацією 5 мкг/мл, оскільки було встановлено, що саме така концентрація забезпечувала максимальний антиадгезивний ефект поверхнево-активних речовин, утворених на базовому середовищі. Було встановлено, що адгезія

спорових клітин *B. subtilis* БТ-2 на пластику, кахлі, сталі і лінолеумі була мінімальною (14–26 %) після обробки цих поверхонь розчином ПАР, синтезованих під час культивування штаму ІМВ В-7241 у середовищі з 0,1 г/л CaCl_2 . Також автори зазначили, що ПАР, синтезовані за наявності катіонів кальцію, проявляли вищу антиадгезивну активність за концентрації 1,25 мкг/мл (ступінь адгезії становив 14-21%), у той час як зниження до аналогічної концентрації ПАР, одержаних на базовому середовищі, призводило до підвищення адгезії клітин *B. subtilis* БТ-2 на оброблених такими ПАР поверхнях удвічі– 29-48%.

На відміну від значної кількості інформації, присвяченій антимікробній активності поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення, у доступній літературі відомостей про їх антиадгезивну дію налічується значно менше.

Так, у статтях [54, 80] показано, що рамноліпіди *P.aeruginosa* W10, а також ліпопептиди *B. subtilis* VSG4 та *Bacillus licheniformis* VS16 за умов вирощування продуцентів у середовищі з різними кількостями гліцерину (2 та 4%, об'ємна частка, відповідно) проявляли антиадгезивну активність щодо представників роду *Staphylococcus* (*S. capitis* SH6, *S. aureus* ATCC 29523), *Bacillus* (*B. licheniformis* CAN55, *B. cereus* ATCC 11778) та інших (*Salmonella typhimurium* ATCC 19430) на різних поверхнях (у тому числі й на нержавіючій сталі [54]) у діапазоні концентрацій 0,09-500 мкг/мл – ступінь інгібування адгезії за дії таких ПАР був у межах 17,4-97%.

У свою чергу, внаслідок порівняння таких літературних відомостей з нашими даними, встановили, що ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за їх культивування у середовищі з очищеним гліцерином та катіонами кальцію, не поступаються за своєю антиадгезивною дією рамноліпідним [54] та ліпопептидним ПАР [80], оскільки адгезія тест-культур до абіотичних поверхонь за дії таких поверхнево-активних речовин у діапазоні менших концентрацій (0,55-

8,87 мкг/мл) становила всього 3-28%, що свідчить про високу антиадгезивну активність ПАР штаму ІМВ В-7241.

Також слід зазначити, що у попередній роботі [1] науковців кафедри біотехнології та мікробіології було представлено порівняння антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення (очищений гліцерин та відходи виробництва біодизелю). Так, адгезія бактеріальних (*B. subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини та спори), *E. cloaceae* С-8, *E. coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1), дріжджових (*C. albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* ЕІ-8) та грибних тест-культур (*A. niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7) на таких абіотичних поверхнях як кахель, сталь та лінолеум, оброблених препаратами ПАР, синтезованих штамом ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю, була у 1,2-4 рази вищою (34-87%), порівняно зі значеннями адгезії за дії поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині – 21-69%.

Отже, отримані в ході дослідження результати (табл. 3.3-3.5) свідчать про можливість посилення антиадгезивної активності ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення, внесенням у середовище культивування катіонів кальцію.

Вплив препаратів ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на прикріплення *Staphylococcus aureus* БМС-1 до різних поверхонь

Варіант культивування <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	Концентрація, мкг/мл	Адгезія, %		
		Кахель	Сталь	Скло
Відходи виробництва біодизелю, 0 г/л CaCl ₂	8,87	23	11	10
	4,43	51	17	17
	2,2	55	19	21
	1,1	58	28	21
	0,55	64	33	24
Відходи виробництва біодизелю, 0,1 г/л CaCl ₂	8,87	62	6	10
	4,43	68	14	24
	2,2	70	14	24
	1,1	77	22	38
	0,55	83	25	52
Відходи виробництва біодизелю, 0,2 г/л CaCl ₂	8,87	17	25	10
	4,43	11	22	7
	2,2	8	14	10
	1,1	9	14	7
	0,55	9	8	7
Очищений гліцерин, 0 г/л CaCl ₂	8,87	19	13	11
	4,43	25	17	17
	2,2	25	23	25
	1,1	30	23	25
	0,55	33	27	30
Очищений гліцерин, 0,1 г/л CaCl ₂	8,87	15	11	10
	4,43	15	15	11
	2,2	20	19	19
	1,1	23	19	25
	0,55	28	26	32
Очищений гліцерин, 0,2 г/л CaCl ₂	8,87	13	8	3
	4,43	19	11	14
	2,2	23	14	17
	1,1	28	19	21
	0,55	28	25	28

Примітки. Табл. 3.3–3.5: Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (адгезія після обробки поверхонь ПАР, синтезованими у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без CaCl₂).

Таблиця 3.4

Вплив наявності катіонів кальцію у середовищі з очищеним гліцерином на антиадгезивну активність

ПАР *Acinetobacter calcoaceticus*

Вміст CaCl ₂ у середовищі, г/л	Концентрація, мкг/мл	Адгезія (%) <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2			Адгезія (%) <i>Enterobacter cloacae</i> С-8			Адгезія (%) <i>Candida albicans</i> Д-6		
		Кахель	Сталь	Скло	Кахель	Сталь	Скло	Кахель	Сталь	Скло
0	8,87	48	45	39	35	37	49	20	37	39
	4,43	40	44	37	33	35	49	20	36	37
	2,2	40	40	35	30	33	47	25	36	37
	1,1	37	36	32	27	27	40	29	35	29
	0,55	34	36	31	27	28	35	34	30	27
0,1	8,87	45	43	35	35	35	49	18	40	39
	4,43	37	43	34	30	35	49	18	41	35
	2,2	37	40	33	30	30	47	23	35	35
	1,1	35	35	30	27	27	43	28	35	28
	0,55	34	29	29	24	28	35	32	27	21
0,2	8,87	43	43	34	30	35	44	17	41	38
	4,43	37	43	33	26	31	41	16	41	30
	2,2	36	41	32	25	29	38	29	31	34
	1,1	35	32	29	22	23	35	29	30	26
	0,55	33	26	28	22	23	30	32	21	21

Таблиця 3.5

Антиадгезивна активність ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності у середовищі з відходами виробництва біодизелю катіонів кальцію

Вміст CaCl ₂ у середовищі, г/л	Концентрація, мкг/мл	Адгезія (%) <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2			Адгезія (%) <i>Enterobacter cloacae</i> С-8			Адгезія (%) <i>Candida albicans</i> Д-6		
		Кахель	Сталь	Скло	Кахель	Сталь	Скло	Кахель	Сталь	Скло
0	8,87	11	21	14	36	30	40	14	16	13
	4,43	16	24	17	33	30	39	19	23	15
	2,2	23	24	26	29	29	37	21	23	15
	1,1	34	30	26	22	26	33	26	26	17
	0,55	35	37	28	21	22	32	33	30	23
0,1	8,87	31	22	25	40	30	54	30	28	19
	4,43	33	30	26	38	27	47	30	38	21
	2,2	36	31	28	31	27	47	22	38	21
	1,1	38	29	31	25	26	38	18	36	26
	0,55	39	33	33	24	25	37	13	36	26
0,2	8,87	49	50	36	37	35	40	28	44	25
	4,43	48	40	33	36	28	38	27	39	30
	2,2	42	34	31	27	23	38	27	31	30
	1,1	42	31	27	26	22	35	21	30	32
	0,55	34	36	25	25	21	35	20	18	32

3.4. Деструкція біоплівки за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію

Окрім антимікробної активності, серед біологічних властивостей поверхнево-активних речовин, синтезованих представниками роду *Acinetobacter*, виділяють і їх здатність до руйнування мікробних біоплівок. Зважаючи на це, на наступному етапі проводили визначення ступеня деструкції бактеріальних і дріжджових біоплівок за впливу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, отриманих у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію.

Результати досліджень показали, що поверхнево-активні речовини, синтезовані у середовищі з очищеним гліцерином та CaCl_2 , ефективніше руйнували бактеріальні та дріжджові біоплівки, ніж ПАР, одержані на базовому середовищі без катіонів кальцію.

Так, з огляду на дані, представлені у таблиці 3.6, можна зазначити, що ступінь деструкції біоплівки *E. cloacae* С-8 за дії розчинів ПАР (0,7-5,5 мкг/мл), синтезованих у середовищі з 0,1 і 0,2 г/л CaCl_2 , становив 83,4-86,5 і 90,9-93,2 % відповідно, у той час як за наявності аналогічних концентрацій препаратів, одержаних на базовому середовищі, був на 8-25 % нижчим (68,7-75,6%). Подібні закономірності спостерігалися і для біоплівок *B. subtilis* БТ-2, *S. aureus* БМС-1 та *C. albicans* Д-6: ступінь деструкції становив 45,1-96 і 44,2-82,1% за наявності ПАР, синтезованих у середовищі з CaCl_2 і базовому відповідно (табл. 3.7-3.9).

Зазначимо, що наявність 0,2 г/л катіонів кальцію у середовищі з відходами виробництва біодизелю впливала на здатність синтезованих ПАР руйнувати мікробні біоплівки лише за певних ефективних концентрацій (табл.3.6-3.9). Так, за концентрацій 5,5 та 0,7 мкг/мл за дії таких ПАР ступінь деструкції біоплівки *E. cloacae* С-8 становив 41-54,5% і був вищий, порівняно з ефективністю ПАР, отриманих у базовому середовищі (11,6-38,6%), у той час як біоплівку *S. aureus* БМС-1 ефективно руйнували ПАР за концентрації 44,3 мкг/мл: деструкція становила 38,1%, що майже на 10% більше, ніж за дії ПАР, синтезованих у базовому середовищі.

Зазначимо, що ступінь руйнування біоплівок досліджуваних тест-культур за дії ПАР, отриманих у середовищі з відходами виробництва біодизелю, був нижчим порівняно з вищезазначеними показниками деструкції після обробки ПАР, синтезованими на очищеному гліцерині, що може бути зумовлено наявністю у складі такого неочищеного субстрату одновалентних катіонів, які пригнічують активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази.

Раніше було показано здатність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, отриманих після культивування продуцента у середовищі з етанолом та 0,1 г/л СаСІ₂, руйнувати мікробні біоплівки [3]. Дослідники встановили, що незалежно від концентрації та ступеня очищення (супернатант, розчин ПАР) препарати ПАР, синтезованих у середовищі з катіонами кальцію, спричиняли вищий ступінь руйнування біоплівки *B. subtilis* БТ-2 (29-58%), порівняно з показниками, встановленими для препаратів, синтезованих на базовому середовищі – 12–45 %. Автори зазначили, що найвищий ступінь деструкції біоплівки тест-культури 57–58 % зафіксували при використанні препаратів ПАР у концентрації 124 мкг/мл.

У літературі представлена обмежена кількість інформації про здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих у гліцеринвмісному середовищі, руйнувати мікробні біоплівки. Однак, нам вдалось знайти статті [39, 80, 81], автори яких визначили здатність ліпопептидів штамів *B.thuringiensis* rak2310, *B. subtilis* VSG4 та *B. licheniformis* VS16, а також ди-рамноліпідів штаму *Burkholderia thailandensis* E264 до руйнування біоплівок бактеріального (*B. subtilis* ВВК006, *S. aureus* АТСС 29523, *S. typhimurium* АТСС 19430, *B. cereus* АТСС 11778) та грибного (*F. oxysporum*) походження. Показано, що такі ПАР ефективно руйнували біоплівки (58-80%) вищенаведених тест-культур лише у діапазоні високих концентрацій – 400-500 мкг/мл, що свідчить про їх нижчу антибіоплівкову активність, у порівнянні з отриманими нами даними щодо ефективності ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному гліцерині за наявності катіонів кальцію – за менших концентрацій (0,55-8,87 мкг/мл) спостерігали вищий ступінь руйнування мікробних біоплівок (68-96%).

Окрім цього, результати попередніх досліджень науковців кафедри біотехнології та мікробіології, представлені у статті [1], засвідчили здатність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення (очищений гліцерин та відходи виробництва біодизелю) руйнувати мікробні біоплівки.

Так, максимальний рівень деструкції біоплівки *E. cloacae* С-8 38–43 % під дією розчинів ПАР, отриманих на відходах виробництва біодизелю, зафіксували за концентрації ПАР 62–124 мкг/мл, у той час як аналогічні показники деструкції спостерігали і за дії ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині, однак їх концентрація була значно нижчою – 0,95–1,9 мкг/мл. Ступінь руйнування біоплівки *Leuconostoc mesenteroides* ПБ-7 під впливом ПАР у кількості 124 мкг/мл, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, був найвищим – 58 %, у той час як за наявності поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині, показник деструкції підвищився до 76–80 % за концентрації ПАР 1,9–3,8 мкг/мл.

Автори зазначили, що на відміну від показників деструкції вищезазначених тест-культур, руйнування біоплівки *S. albicans* Д-6 за дії ПАР, синтезованих у середовищі з відходами виробництва біодизелю, практично не відбувалось, причому в діапазоні усіх досліджуваних концентрацій (0,95–124 мкг/мл). Однак за найвищих концентрацій (62–124 мкг/мл) поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному субстраті, вдалось досягти руйнування біоплівки даної тест-культури – ступінь деструкції становив 37–47 % [1].

Підсумовуючи все вищезазначене, одержані експериментальні дані (табл. 3.6-3.9) засвідчують можливість посилення здатності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 до руйнування як бактеріальних, так і дріжджових біоплівок внесенням у середовище культивування продуцента з очищеним гліцерином катіонів кальцію.

**Руйнування біоплівки *Enterobacter cloacae* С-8 під впливом ПАР,
синтезованих за наявності катіонів кальцію**

Джерело вуглецю	Концентрація CaCl ₂ (г/л)	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)		
		5,5	1,4	0,7
Відходи виробництва біодизелю	0	38,6	32,9	11,6
	0,1	48,8	41	23,8
	0,2	54,5	36,3	41
Очищений гліцерин	0	68,7	71,5	75,6
	0,1	86,2	83,4	86,5
	0,2	92	93,2	90,9

Примітки. Табл. 3.6–3.9: під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %. $P \leq 0,05$ відносно контролю (деструкція біоплівки за дії ПАР, синтезованих у процесі культивування штаму ІМВ В-7241 на середовищі без індукторів).

**Вплив катіонів кальцію на здатність ПАР руйнувати біоплівку
Bacillus subtilis БТ-2**

Джерело вуглецю	Концентрація CaCl ₂ (г/л)	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)					
		44,3	22,2	5,5	2,7	1,4	0,7
Відходи виробництва біодизелю	0	52,6	45,3	42,1	33,7	33,7	20
	0,1	33,7	36,8	44,2	46,3	47,4	Н.в.
	0,2	38,9	25,3	26,3	32,6	34,7	27,4
Очищений гліцерин	0	44,2	51,6	59,7	72,3	81,5	80,2
	0,1	45,1	59,7	64,7	79,2	85,2	Н.в.
	0,2	47,4	63,1	68,4	85,2	87,3	Н.в.

Примітка. Н.в. – не визначали.

**Деструкція біоплівки *Staphylococcus aureus* БМС-1 за дії ПАР,
отриманих у середовищі з катіонами кальцію**

Джерело вуглецю	Концентрація CaCl ₂ (г/л)	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)		
		44,3	2,7	1,4
Відходи виробництва біодизелю	0	28,8	28,8	36,7
	0,1	29,5	29,5	23,7
	0,2	38,1	32,4	23,7
Очищений гліцерин	0	74,5	64,7	55,6
	0,1	89,3	69,3	56,1
	0,2	94,2	72,6	58,3

**Антибіоплівкова активність ПАР, синтезованих з катіонами кальцію,
щодо *Candida albicans* Д-6**

Джерело вуглецю	Концентрація CaCl ₂ (г/л)	Деструкція біоплівки (%) за дії ПАР у концентрації (мкг/мл)			
		22,2	5,5	1,4	0,7
Відходи виробництва біодизелю	0	71,4	60,2	53	55,1
	0,1	25,5	33,7	37,7	40,8
	0,2	33,7	43,9	55,1	61,2
Очищений гліцерин	0	79,1	82,1	76,5	72,3
	0,1	85,6	89,5	86,4	78,2
	0,2	92,8	96	91,8	84,7

**РОЗДІЛ 4. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241,
СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ІНДУКТОРІВ**

**4.1. Антимікробна активність поверхнево-активних речовин,
синтезованих за наявності біологічних індукторів**

Дослідження щодо впливу конкурентних мікроорганізмів на синтез антимікробних сполук можна умовно поділити на три групи:

1) обидва штами (і продуцент, і конкурентний мікроорганізм) вносять у середовище культивування антимікробних метаболітів у співвідношенні 1:1, тобто у практично однаковій концентрації [82, 83];

2) живі або інактивовані клітини індуктора вносять у середовище у значно нижчій концентрації порівняно з клітинами продуцента цільових метаболітів [84, 85];

3) як індуктор використовують супернатант (фільтрат) після вирощування конкурентного мікроорганізму [85, 86].

Для кожної з цих трьох груп досліджень використовується і відповідна термінологія. Перша група – це так зване класичне спільне культивування двох мікроорганізмів, культивування штучних мікробних асоціацій (консорціумів). Використовувані у дослідженнях другої і третьої групи конкурентні мікроорганізми (або їх супернатанти) називаються індукторами, або елісителями.

У даному дослідженні було використано як індуктор клітини *B. subtilis* БТ-2. Вибір був зумовлений такими причинами. У роботах [87, 88] зазначається, що під час спільного культивування відбувається імітація природних умов, і у боротьбі за субстрат активуються «мовчазні» гени, відповідальні за синтез сполук з антимікробною щодо конкурентного мікроорганізму активністю. Це справедливо насамперед для мікроорганізмів, виділених з спільних місць існування. Тому як конкурентні мікроорганізми або індуктори для підвищення

					НУХТ БТЕК 02.02.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Ярова Г.А.			Розділ 4. Біологічна активність поверхнево-активних речовин <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Пирог Т.П.					66	20
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

антимікробної активності антибіотиків, синтезованих ґрунтовими стрептоміцетами, дослідники обирали штами *B. subtilis*, які є типовими мешканцями таких місць існування [89]. Зазначимо, що продуцент ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 також ізольований з ґрунту [90], як і представники роду *Bacillus*.

Так, у *табл. 4.1* наведено результати антимікробної активності поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення за наявності біологічних індукторів.

Представлені у *табл. 4.1* дані свідчать про те, що найефективнішими з використовуваних індукторів (живі, інактивовані клітини, супернатант) виявилися живі клітини *B. subtilis* БТ-2: внесення їх у середовище з обома субстратами супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур були в 3–23 рази нижчими, ніж встановлені для поверхнево-активних речовин, утворених на середовищі без цього індуктора. За наявності інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином і відходами виробництва біодизелю синтезувалися ПАР, показники МІК яких щодо бактерій становили 0,7–4,4 мкг/мл, що у 2–8 раз нижче порівняно з значеннями, встановленими для поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі без індуктора. Зазначимо, що ПАР, синтезовані за наявності індукторів, проявляли високу антимікробну дію не тільки щодо *B. subtilis* БТ-2, а й інших грампозитивних (*Staphylococcus aureus* БМС-1) та грамнегативних (*Proteus vulgaris* ПА-12, *Enterobacter cloacae* С-8) бактерій (див. *табл. 4.1*).

Антибактеріальна активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за дії біологічних індукторів

Субстрат для синтезу ПАР	Біологічний індуктор	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо			
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	2,8	2,8	5,6	5,6
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,23	0,23	1,84	0,46
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,4	1,4	1,4	0,7
	Супернатант	1,4	2,8	2,8	1,4
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	9,8	4,9	9,8	19,6
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,85	0,85	1,7	0,85
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,2	2,2	2,2	4,4
	Супернатант	4,6	2,3	4,6	18,4

Примітка. Під час визначення мінімальних інгібуючих концентрації похибка не перевищувала 5 %.

Так, найменш ефективним з досліджуваних індукторів виявився супернатант: антимікробна щодо більшості бактеріальних тест-культур активність ПАР, синтезованих за його наявності, була всього у два рази нижчою, ніж поверхнево-активних речовин, утворених без індуктора (див. *табл. 4.1*).

Дані щодо дослідження дії ПАР, синтезованих за наявності індукторів, на дріжджі роду *Candida* наведено у *табл. 4.2*. Ці дані свідчать про те, що використання як індукторів живих клітин *B. subtilis* БТ-2 супроводжувалося синтезом ПАР з найвищою антифунгальною активністю (МІК 1,87–7,0 мкг/мл), менш ефективними індукторами виявилися інактивовані клітини цих бактерій (МІК 2,8–9,0 мкг/мл), а супернатант у більшості випадків не спричиняв позитивної дії (МІК 11,2–18,4 мкг/мл). Лише внесення супернатанту у середовище з відходами виробництва біодизелю дало змогу підвищити у два рази антимікробну щодо *Candida tropicalis* РЕ-2 активність синтезованих поверхнево-активних речовин.

Варто відмітити, що й літературні дані щодо ефективності використання як індукторів живих, інактивованих клітин чи відповідного супернатанту відрізняються. Так, у роботі [91] зазначається, що спектр метаболітів, синтезованих актинобактеріями за наявності живих клітин індукторів, був ширшим, ніж у разі використання інактивованих тепловою обробкою клітин. У той же час синтез феназину *Pseudomonas aeruginosa* підвищувався практично однаково незалежно від фізіологічного стану (живі чи інактивовані клітини) індукторів *Escherichia coli*, *B. subtilis* і *Saccharomyces cerevisiae* [84]. Використання як індуктора супернатанту *Streptomyces bullii* С2 не спричиняло позитивного впливу на синтез антимікробних сполук грибом *Aspergillus fumigatus* МВС-F1-10, у той час як за наявності живих клітин індуктора спостерігали синтез нових дев'яти антимікробних метаболітів, не утворюваних монокультурою продуцента [85]. Wang із співавт. [86] встановили, що супернатант *Penicillium chrysogenum* AS 3.5163 виявився ефективнішим індуктором синтезу антибіотика натаміцину штамом *Streptomyces natalensis* НВ-2, ніж інактивовані автоклавуванням клітини

гриба (підвищення концентрації антибіотика в 3,4 і 1,4 рази відповідно). Такі дані свідчать про різні механізми, що лежать в основі підвищення синтезу чи активності антимікробних сполук, синтезованих за дії індукторів.

Слід зазначити, що роботи, в яких досліджується вплив на активність антимікробних метаболітів індукторів різного фізіологічного стану (живі та інактивовані клітини) є небагаточисельними. Дослідники переважно використовують як індуктори живі клітини мікроорганізмів, рідше – тільки термічно інактивовані або автоклавовані і дуже рідко – супернатант після вирощування мікроорганізмів-індукторів.

Отримані дані щодо вищої ефективності живих клітин індуктора порівняно з інактивованими чи супернатантом можуть свідчити про те, що індукуючий фактор зв'язаний з клітинами, причому індукція потребує як хімічної, так і біологічної взаємодії між продуцентом ПАР та індуктором. Процес автоклавовання клітин індуктора призводить до денатурації білків та інших макромолекул, частково пригнічуючи потенційні біохімічні взаємодії. Крім цього, використання інактивованих клітин індуктора є доцільнішим з технологічної точки зору.

Вплив біологічних індукторів на антифунгальну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення

Субстрат для синтезу ПАР	Біологічний індуктор	Мінімальні інгібуючі концентрації (мкг/мл) щодо	
		<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	11,2	11,2
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,87	3,75
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,8	5,6
	Супернатант	11,2	11,2
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	19,7	19,7
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	3,5	7,0
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	4,5	9,0
	Супернатант	9,2	18,4

Примітка. Під час визначення мінімальних інгібуючих концентрацій похибка не перевищувала 5 %.

4.2. Здатність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів, до руйнування біоплівки

Зважаючи на результати антимікробної дії ПАР, на наступному етапі досліджували роль у руйнуванні біоплівки поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення.

Так, у табл. 4.3 наведено показники деструкції біоплівки під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю за наявності живих клітин *B. subtilis* БТ-2.

Таблиця 4.3

Деструкція біоплівки під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю за наявності живих клітин *B. subtilis* БТ-2

Тест-культура	Наявність індуктора у середовищі	Деструкція біоплівки (%) за концентрації ПАР (мкг/мл)				
		60	120	240	480	960
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	–	50	51	51	52	55
	+	55	55	55	61	65
<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	–	65	70	70	71	71
	+	60	70	70	81	81
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	–	52	58	61	66	70
	+	76	77	77	77	77
<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	–	40	45	52	57	58
	+	53	54	57	62	63
<i>Candida albicans</i> Д-6	–	26	30	31	35	38
	+	39	42	48	51	52

Примітка: під час визначення деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Підвищення ступеня руйнування біоплівки бактеріальних і дріжджових тест-культур спостерігали лише за дії ПАР, синтезованих за наявності у середовищі з відходами виробництва біодизелю живих клітин індуктора. Використання як індукторів інактивованих клітин або супернатанту

супроводжувалось утворенням ПАР, за дії яких значення ступеня деструкції біоплівки було аналогічним значенню за дії препаратів, синтезованих у середовищі без індуктора (табл. 4.4. і 4.5). У разі використання нижчих за 60 мкг/мл концентрацій ПАР, одержаних при культивуванні *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю за наявності живих клітин *B. subtilis* БТ-2, деструкція як бактеріальних, так і дріжджових біоплівок не відрізнялась від такої за дії препаратів, синтезованих без індуктора.

Суттєва різниця (9-10 %) у деструкції біоплівок *B. subtilis* БТ-2 та *E. cloacae* С-8 за наявності ПАР, синтезованих за наявності індуктора і без нього спостерігалася лише у разі використання ПАР у діапазоні найвищих концентрацій 480-960 мкг/мл. У той же час ступінь руйнування біоплівки *P. vulgaris* ПА-12 під впливом ПАР, утворених під час культивування штаму ІМВ В-7241 у середовищі з індуктором, становив 76-77 % незалежно від концентрації ПАР і був вищим на 7-24 % порівняно зі ступенем деструкції за дії препаратів, одержаних без індуктора. Найбільша різниця становила 19-24 % у показниках руйнування біоплівки *Proteus vulgaris* ПА-12 під впливом ПАР, синтезованих з індуктором і без нього, спостерігалася у разі використання препаратів, концентрації яких були в межах 60-120 мкг/мл.

Ступінь руйнування дріжджових біоплівок за дії ПАР, синтезованих за наявності *B. subtilis* БТ-2 був вищим на 5-17 %, порівняно з показниками деструкції під впливом препаратів, одержаних без такого індуктора. При використанні ПАР, одержаних під час культивування штаму ІМВ В-7241 з індуктором, деструкція біоплівки *S. tropicalis* РЕ-2 була достатньо високою і становила 53-63 % у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій ПАР. Ступінь руйнування біоплівки *Candida albicans* Д-6 перевищував 50 % тільки під впливом препаратів у високих концентраціях (480-960 мкг/мл), утворених за наявності індуктора.

На відміну від інших бактеріальних біоплівок (див. табл. 4.3), збільшення деструкції біоплівки *Staphylococcus aureus* БМС-1 спостерігали у разі

використання ПАР, синтезованих за наявності усіх індукторів (супернатанту, живих та інактивованих клітин *Bacillus subtilis* БТ): ступінь руйнування біоплівки був вищим на 10-19 %, ніж за дії препаратів, одержаних під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у середовищі без індукторів (рис. 4.1).

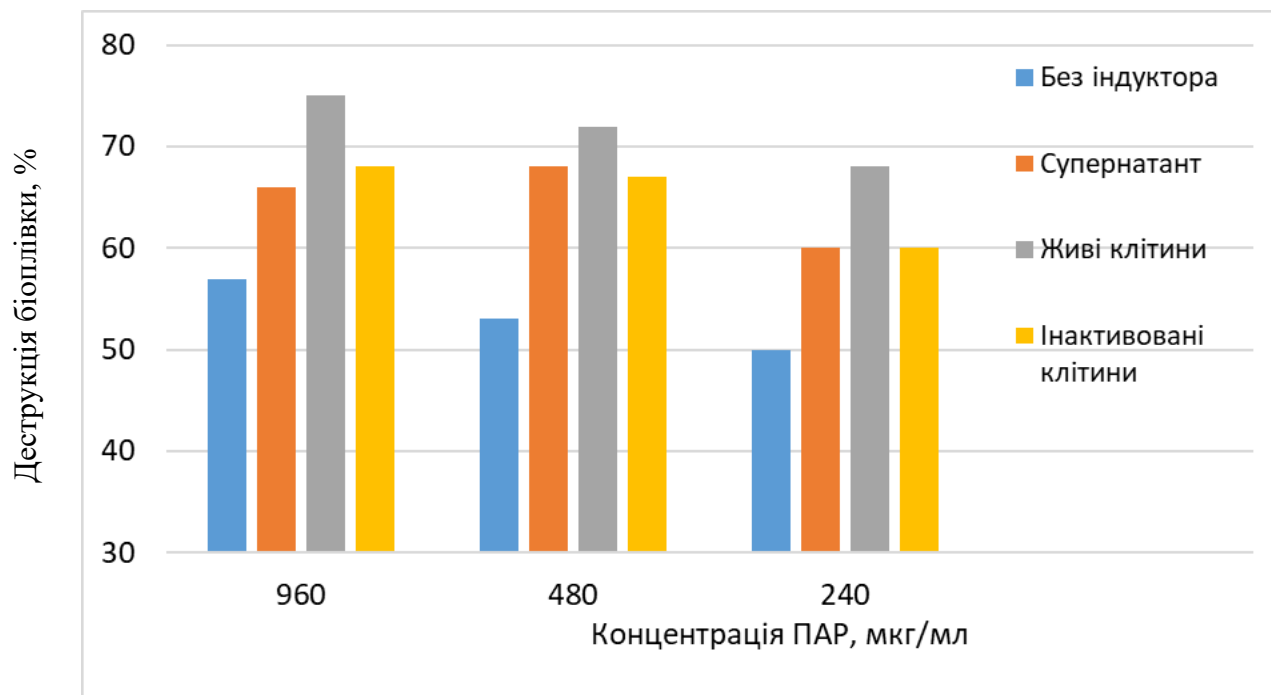


Рис. 4.1. Вплив біологічних індукторів у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з відходами виробництва біодизелю на здатність синтезованих ПАР руйнувати біоплівку *Staphylococcus aureus* БМС-1

За дії нижчих концентрацій ПАР (7,5-120 мкг/мл), синтезованих на відходах виробництва біодизелю за наявності супернатанту, живих та інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2, деструкція біоплівки *S. aureus* БМС-1 була такою самою, як і під впливом ПАР, одержаних у середовищі без індукторів.

Представлені у табл. 4.4 результати свідчать про те, що на відміну від культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю, під час вирощування продуцента ПАР на очищеному гліцерині за наявності як живих, так і інактивованих клітин індуктора, а також і супернатанту відбувався синтез поверхнево-активних речовин, під впливом яких деструкція бактеріальних

біоплівки була в середньому на 10-20 % вищою порівняно з показниками за дії препаратів, синтезованих без індуктора.

Таблиця 4.4

Вплив ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині за наявності *B. subtilis* БТ-2, на руйнування бактеріальних біоплівок

Тест-культури	Індуктор у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за концентрації ПАР (мкг/мл)					
		240	120	60	30	15	7,5
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	Без індуктора	55	54	43	40	38	35
	Супернатант	54	52	41	40	36	36
	Живі клітини	64	60	58	50	50	48
	Інактивовані клітини	59	58	50	45	43	40
<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	Без індуктора	38	33	31	30	30	28
	Супернатант	56	52	48	40	34	33
	Живі клітини	65	65	50	46	40	36
	Інактивовані клітини	55	53	48	40	35	33
<i>Enterobacter cloacae</i> С-8	Без індуктора	55	55	50	40	35	30
	Супернатант	60	60	55	55	45	40
	Живі клітини	80	75	73	70	70	65
	Інактивовані клітини	76	68	65	60	55	51
<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	Без індуктора	38	38	38	36	32	29
	Супернатант	47	45	45	40	40	36
	Живі клітини	58	55	55	50	43	42
	Інактивовані клітини	58	52	50	48	40	40

Примітка: під час визначення деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Другою принциповою відмінністю ПАР, синтезованих на очищеному гліцерині за наявності індукторів, від препаратів, одержаних в аналогічних умовах культивування продуцента на відходах виробництва біодизелю, є нижча ефективна концентрація, що забезпечувала максимальну (понад 50 %) деструкцію бактеріальних біоплівки (30-240 і 60-960 мкг/мл відповідно, *табл. 4.3 і 4.4*).

Найефективнішим індуктором під час культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині виявилися живі клітини *B. subtilis* БТ-2, оскільки синтезовані за їх наявності ПАР характеризувалися вищою здатністю до руйнування більшості бактеріальних біоплівки, ніж ПАР одержані з використанням інактивованих клітин індуктора чи супернатанту.

Дані щодо дослідження руйнування дріжджових біоплівки за дії ПАР, синтезованих за наявності індукторів, на дріжджі роду *Candida* наведено у *табл. 4.5*.

Таблиця 4.5

**Руйнування дріжджових біоплівки за дії ПАР, синтезованих
A. calcoaceticus ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині за наявності живих
та інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2**

Тест-культури	Індуктор у середовищі культивування	Деструкція біоплівки (%) за концентрації ПАР (мкг/мл)					
		240	120	60	30	15	7,5
<i>Candida tropicalis</i> PE-2	Без індуктора	43	42	40	39	33	30
	Живі клітини	57	57	56	54	53	42
	Інактивовані клітини	51	50	45	45	43	43
<i>Candida albicans</i> Д-6	Без індуктора	41	41	41	36	28	23
	Живі клітини	64	60	55	46	46	45
	Інактивовані клітини	48	48	42	40	34	30

Примітка: під час визначення деструкції біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Підвищення ступеня руйнування дріжджових біоплівочок під впливом ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині за наявності індукторів, відбувалось лише у разі використання як індукторів живих та інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2, причому живі клітини виявилися ефективнішими індукторами порівняно з інактивованими, у той час як за використання супернатанту такої дії не спостерігали.

Ступінь деструкції дріжджових біоплівочок за дії ПАР, утворених під час культивування штаму ІМВ В-7241 у середовищі з живими клітинами індуктора, був на 6-16 і 10-23 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, синтезованих у середовищі з інактивованими клітинами *B. subtilis* БТ-2 і без індуктора відповідно.

Як і деструкція бактеріальних біоплівочок (див. *табл. 4.4*), так і руйнування біоплівочок *C. tropicalis* РЕ-2 і *C. albicans* Д-6 були максимальними (40-64 %) за дії ПАР, синтезованих за наявності індуктора, у діапазоні концентрацій 30-240 мкг/мл. Аналогічні показники деструкції дріжджових біоплівочок під впливом ПАР, синтезованих у середовищі з відходами виробництва біодизелю та біологічними індукторами, спостерігали за вищої концентрації ПАР (60-960 мкг/мл, *табл. 4.3*).

Разом з тим, літературні дані щодо підвищення показників деструкції біоплівочок за рахунок спільного культивування мікроорганізмів або/чи використання як індукторів живих, інактивованих клітин чи супернатанту є небагаточисельними.

Так, авторами статті [92] було встановлено, що в ході спільного культивування продуцентів сполук бактеріоцинової природи (штами *Lactococcus lactis* VB69 і VB94, *Lactobacillus sakei* MBSa1, *Lactobacillus curvatus* MBSa3) з іншими пробіотичними молочнокислими бактеріями (*L. lactis* 368, *Lactobacillus helveticus* 354, *Lactobacillus casei* 40, *Weissella viridescens* 113) відбувався синтез поверхнево-активних речовин, що ефективно впливали на руйнування біоплівки таких патогенів як *Listeria monocytogenes* АТСС 7644, *Escherichia coli* O157: Н7 і *Salmonella typhimurium* АТСС 14028. Повне інгібування біоплівочок даних

патогенних тест-культур спостерігали під дією *L. lactis* 368 (bac-), *L. curvatus* MBSa3 (bac +) і *Lactobacillus sakei* MBSa1 (bac +) через 24, 48 та 72 год.

Іншими дослідниками було встановлено [93] здатність ліпопептидів, синтезованих внаслідок спільного вирощування *B. subtilis* та *Lactobacillus rhamnosus* (штами не вказано), до деструкції біоплівки *S. aureus* ATCC 25923 – ліпопептидвмісний супернатант руйнував біоплівку тест-культури після 24 год.

У роботі [94] дослідники встановили що гліколіпіди, синтезовані *Staphylococcus lentus* SZ2 за наявності *Vibrio harveyi*, є ефективнішими щодо *Vibrio harveyi*, порівняно з ПАР, отриманими у середовищі без індуктора. При цьому здатність до деструкції біоплівки тест-культури визначали протягом 6-72 год. Встановлено, що ступінь деструкції біоплівки *V. harveyi* за дії ПАР, синтезованих за наявності індуктора, був вищим і становив 42,43-83,95%, у той час як за обробки ПАР, отриманих за відсутності індуктора, спостерігали руйнування біоплівки тест-культури на 11,84-82,69%.

Антибіоплівкову активність метаболітів, синтезованих при спільному культивуванні актиноміцетів *Micromonospora* sp. UR56 та *Actinokineospora* sp. EG49, визначили і Ніфнауу зі співавторами [95]. Так, після вирощування штамів UR56 та EG49 отримали такі сполуки як диметилфеназин-1,6-дикарбоксилат (1), монометилловий ефір феназин-1,6-дикарбонової кислоти (2), феназин-1-карбонової кислоти (3), N-(2-гідроксифеніл)-ацетамід (9) і п-анісамід (10), які не синтезувались при вирощуванні монокультур цих актиноміцетів. Отримані речовини ефективно руйнували біоплівки *S. aureus* ATCC9144, *B. subtilis* ATCC29212, *E. coli* ATCC25922 та *P. aeruginosa* ATCC27853 – ступінь деструкції цих тест-культур за дії метаболітів 1-3, 9 та 10 становив 11,47-75,1%, 4,91-20,29%, 34,55-57,47% та 7,39-93,98% відповідно. При цьому метаболіт 3 (феназин-1-карбонової кислоти) не проявляв антибіоплівкової активності щодо *S. aureus* ATCC9144 та *B. subtilis* ATCC29212.

Таким чином, отримані результати показують, що здатність ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 до руйнування біоплівок залежить від стану біологічних

індукторів (живі клітини, інактивовані чи супернатант). Зазначимо, що у доступній літературі наявно вкрай недостатньо інформації на цю тему. Також слід звернути увагу на той факт, що ПАР, синтезовані за наявності біологічних індукторів, руйнували біоплівки досліджуваних тест-культур у досить низьких концентраціях – 7,5-960 мкг/мл.

4.3. Вплив біологічних індукторів на антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241

Окрім описаних вище властивостей, поверхнево-активним речовинам притаманна і антиадгезивна активність. Зважаючи на це, далі визначали антиадгезивну активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення.

Так, дані подані у *табл. 4.6*, свідчать про те, що за дії ПАР, отриманих у середовищі з очищеним гліцерином за наявності як живих, так і інактивованих клітин індуктора, а також і супернатанту, у діапазоні концентрацій 12-96 мкг/мл адгезія бактеріальних тест-культур становила 13-63% і була нижчою, порівняно з показниками адгезії за наявності ПАР, синтезованих без індуктора (48-100%).

Подібні закономірності спостерігались і за вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва біодизелю (*табл. 4.7*): за дії ПАР, утворених у середовищі з індукторами, ступінь адгезії клітин бактеріальних тест-культур на абіотичних матеріалах був нижчим (17-76%), порівняно зі значеннями адгезії після обробки ПАР, одержаними за відсутності індуктора – 33-100%. Однак зазначимо, що кількість прикріплених до сталі клітин *P. vulgaris* ПА-12 після обробки розчином ПАР, отриманих за наявності індуктора, була такою ж, як і за дії ПАР, утворених без індуктора.

Показники антиадгезивної активності ПАР, синтезованих як на очищеному гліцерині, так і на неочищеному субстраті за присутності біологічних індукторів, щодо *B. subtilis* БТ-2 зафіксували лише за найвищих концентрацій розчинів ПАР (48-96 мкг/мл) – ступінь адгезії тест-культури становив 10-78% і був дещо нижчим, у порівнянні зі значеннями за обробки розчином ПАР, утворених без індуктора (11-90%).

Разом з тим, дані наведені у *табл. 4.8* свідчать про те, що наявність живих, інактивованих клітин та супернатанту *B. subtilis* БТ-2 у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 як з очищеним гліцерином, так і з відходами

виробництва біодизелю, спричинила позитивний вплив на антиадгезивні властивості синтезованих ПАР щодо дріжджових тест-культур. Незалежно від концентрації за дії таких ПАР спостерігали зниження адгезії *C.tropicalis* PE-2 та *C. albicans* Д-6 до значень 9-56% як на сталі, так і на лінолеумі, у порівнянні з показниками антиадгезивної активності ПАР, утворених за відсутності індуктора (49-100%).

Варто зазначити, що дані наведені у табл. 4.6-4.8 свідчать про те, що внесення індукторів у середовище культивування штаму *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з гліцирином різного ступеня очищення супроводжується підвищенням антиадгезивної активності таких ПАР при їх застосуванні у різних концентраціях, однак прямої кореляції між їх антимікробною та антиадгезивною дією не встановлено, що свідчить про наявність не лише антимікробної активності, але й інших механізмів в основі антиадгезивної дії ПАР.

На відміну від значної кількості інформації, присвяченій антимікробній активності ПАР, синтезованих на гліцерині, відомостей про їх антиадгезивну дію налічується значно менше.

Так, Chebbi зі співавторами у роботі [54] встановили антиадгезивну дію рамноліпідів *P.aeruginosa* W10, синтезованих у середовищі з очищеним гліцирином (2%, об'ємна частка), щодо *Staphylococcus capitis* SH6 та *Bacillus licheniformis* CAN55. Так, інгібування адгезії штаму SH6 до нержавіючої сталі було у межах 57-97% за концентрацій ПАР 0,78-25 мг/мл, у той час як пригнічення адгезії штаму CAN55 становило 78-93% за дії ПАР у концентрації 0,09-25 мкг/мл.

Крім цього, упродовж останніх років дослідниками кафедри біотехнології та мікробіології у роботі [55] було встановлено порівняння біологічних властивостей (у тому числі й антиадгезивної активності) поверхнево-активних речовин *A.calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю. Так, адгезія бактеріальних (*B. subtilis* БТ-2 (вегетативні клітини та спори), *Enterobacter cloacae* С-8, *E. coli* ІЕМ-1, *S. aureus* БМС-1),

дріжджових (*Candida albicans* Д-6, *C. tropicalis* РЕ-2, *C. utilis* ЕІ-8) та грибних тест-культур (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7) на абіотичних поверхнях (кахель, сталь, лінолеум), оброблених препаратами ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, була у 1,2-4 рази нижчою (34-87%), порівняно зі значеннями адгезії за дії поверхнево-активних речовин, отриманих на очищеному гліцерині – 21-69%.

Таким чином, отримані результати, представлені у *табл. 4.6-4.8*, засвідчують можливість посилення антиадгезивної активності ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення, за внесення у середовище культивування продуцента ПАР *B. subtilis* БТ-2 у вигляді живих та інактивованих клітин, а також супернатанту.

Антиадгезивна активність ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності у середовищі з очищеним гліцерином біологічних індукторів, щодо бактерій

Індуктор	Концентрація ПАР, мкг/мл	Адгезія клітин, %							
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2		<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12		<i>Enterobacter cloacae</i> С-8		<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	
		Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум
Контроль (без індуктора)	96	89	90	63	76	86	62	100	83
	48	33	30	100	48	81	100	100	33
	24	11	20	63	75	57	77	75	83
	12	11	20	75	75	57	100	75	83
Супернатант	96	78	100	50	20	56	46	25	17
	48	44	70	13	25	36	57	50	17
	24	44	60	13	25	43	32	25	33
	12	11	20	13	25	56	36	25	17
Інактивовані клітини	96	67	60	13	56	44	46	50	33
	48	67	50	63	25	62	21	50	50
	24	44	30	100	50	25	21	25	17
	12	11	20	50	50	37	43	50	17
Живі клітини	96	44	30	13	25	50	28	25	33
	48	33	20	50	16	37	36	25	17
	24	22	20	88	16	56	36	50	33
	12	22	80	63	24	69	32	50	33

Примітка. Табл. 4.6-4.8: під час визначення антиадгезивної активності похибка не перевищувала 5 %.

Адгезія бактерій за дії ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих на відходах виробництва біодизелю за наявності біологічних індукторів

Індуктор	Концентрація ПАР, мкг/мл	Адгезія клітин, %							
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2		<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12		<i>Enterobacter cloacae</i> С-8		<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	
		Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум
Контроль (без індуктора)	96	44	30	38	96	64	75	50	33
	48	44	20	63	75	88	100	100	33
	24	22	20	63	100	87	89	100	83
	12	11	10	100	56	86	68	50	83
Супернатант	96	11	10	87	76	31	32	25	17
	48	22	20	100	84	44	43	25	17
	24	22	50	100	92	50	28	25	17
	12	33	50	100	80	56	32	50	50
Інактивовані клітини	96	33	80	92	36	62	39	25	67
	48	78	60	67	36	69	28	25	17
	24	44	80	75	60	69	39	50	33
	12	67	10	75	76	75	36	50	17
Живі клітини	96	11	90	100	76	62	57	25	17
	48	11	80	92	64	50	43	50	17
	24	33	70	92	36	50	46	25	33
	12	78	50	92	28	37	46	25	17

**Антиадгезивна активність ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241,
утворених у середовищі з *Bacillus subtilis* БТ-2, щодо дріжджів**

Джерело вуглецю	Індуктор	Концентрація ПАР, мкг/мл	Адгезія клітин, %			
			<i>Candida tropicalis</i> PE-2		<i>Candida albicans</i> Д-6	
			Сталь	Лінолеум	Сталь	Лінолеум
Очищений гліцерин	Контроль (без індуктора)	96	50	59	100	100
		48	40	65	97	91
		24	50	37	91	86
		12	50	33	83	86
	Супернатант	96	10	13	40	56
		48	10	19	18	47
		24	10	13	18	45
		12	10	24	17	28
	Інактивовані клітини	96	40	19	37	26
		48	40	24	26	26
		24	20	32	26	26
		12	10	19	14	23
	Живі клітини	96	10	14	37	45
		48	20	15	36	28
		24	20	15	36	28
		12	30	18	14	26
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	96	90	56	63	100
		48	70	71	71	86
		24	60	49	71	82
		12	90	64	54	68
	Супернатант	96	30	37	11	38
		48	40	38	11	35
		24	50	33	17	19
		12	70	24	20	18
	Інактивовані клітини	96	30	20	9	43
		48	30	32	9	29
		24	40	27	36	19
		12	40	42	36	17
	Живі клітини	96	20	51	54	29
		48	30	52	36	30
		24	30	19	9	26
		12	50	15	9	13

ВИСНОВКИ

1. Внесення катіонів кальцію у середовище культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з очищеним гліцерином супроводжувалось підвищенням активності НАДФ⁺-глутаматдегідрогенази у 2,5–3 рази (401-476 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білку) порівняно з показниками активності при вирощуванні на базовому середовищі. При додаванні CaCl₂ у середовище з відходами виробництва біодизелю НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназна активність була аналогічна показникам активності у базовому середовищі.

2. Додаткове внесення 0,1-0,2 г/л хлориду кальцію у середовище з очищеним гліцерином супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були відповідно в 1,4-29 разів нижчими, адгезія бактерій і дріжджів на абіотичних матеріалах, оброблених такими ПАР, на 5-8% нижчою, а ступінь руйнування біоплівки на 8–25 % вищим порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на базовому середовищі. Підвищення біологічної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, спостерігали лише у разі внесення у середовище хлориду кальцію у концентрації 0,2 г/л.

3. Внесення живих клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовище з очищеним гліцерином та відходами виробництва біодизелю супроводжувалося синтезом ПАР, МІК яких щодо досліджуваних тест-культур були в 3–23 рази нижчими (0,23-7 мкг/мл), адгезія тест-культур за дії таких ПАР на 12-24 % нижчою (9-88%), а ступінь деструкції біоплівки на 10-16 % вищим (36-81%), ніж встановлені для ПАР, утворених на середовищі без цього індуктора.

4. За наявності інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з обома субстратами синтезувалися ПАР, показники МІК яких щодо бактерій та дріжджів були у 2–8 раз нижче, ступінь руйнування біоплівки на 5-22% вищим, а показники адгезії на 23-25%

нижчими, порівняно зі значеннями, встановленими для поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі без індуктора.

5. Антимікробна для більшості тест-культур активність ПАР, синтезованих за наявності супернатанту *B. subtilis* БТ-2, була всього у два рази нижчою, ступінь руйнування біоплівки *S. aureus* БМС-1 вищим на 10-14%, а значення адгезії бактеріальних та дріжджових тест-культур на 8-23% нижчими, ніж для поверхнево-активних речовин, утворених без індуктора.

6. Отримані результати засвідчують можливість регуляції біологічної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 зміною у складі середовища культивування продуцента вмісту катіонів кальцію та внесенням у середовище культивування штаму ІМВ В-7241 біологічних індукторів (клітин конкурентних бактерій *B. subtilis* БТ-2).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т. П., Луцай Д.А., Шевчук Т.А., Іутинська Г.О., Ельперін І.В. Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині. *Мікробіологічний журнал*. 2018, 80 (2):14-27.
2. Пирог Т. П., Ключка Л. В., Шевчук Т. А., Мучник Ф. В. Взаємозв'язок хімічного складу і біологічних властивостей мікробних поверхнево-активних речовин. *Мікробіологічний журнал*. 2019, 81(3): 84–104.
3. 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.
4. Alves A.R., Sequeira A.M., Cunha Â. Increase of bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 2019. doi: 10.1111/lam.13169.
5. Hifnawy S.M., Hassan H.M., Mohammed R., Fouda M.M., Sayed A.M., Hamed A.A., Abdelmohsen U.R. Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*. 2020, 18(5): 243. doi:10.3390/md18050243.
6. Dobler L., Ferraz H. C., Araujo de Castilho L. V., Sangenito L. S., Pasqualino I. P., Souza dos Santos A. L., Almeida R. V. Environmentally friendly rhamnolipid production for petroleum remediation. *Chemosphere*. 2020: 126349. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126349.
7. Eraqi W. A., Yassin A. S., Ali A. E., Amin M. A. Utilization of Crude Glycerol as a Substrate for the Production of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Research International*. 2016: 1–9. doi:10.1155/2016/3464509.
8. Saikia R. R., Deka S., Deka M., Sarma H. Optimization of environmental factors for improved production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas*

aeruginosa RS29 on glycerol. *Journal of Basic Microbiology*. 2011, 52(4): 446–457. doi:10.1002/jobm.201100228.

9. Wu J.-Y., Yeh K.-L., Lu W.-B., Lin C.-L., Chang J.-S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresource Technology*. 2008, 99(5): 1157–1164. doi:10.1016/j.biortech.2007.02.026.

10. Singh A. K., Cameotra, S. S. Rhamnolipids Production by Multi-metal-Resistant and Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170(5): 1038–1056. doi:10.1007/s12010-013-0244-9.

11. Sood U., Singh D. N., Hira P., Lee J.-K., Kalia V. C., Lal R., Shakarad M. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *Journal of Biotechnology*. 2019. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.11.004.

12. Wu J., Zhang J., Wang P., Zhu L., Gao M., Zheng Z., Zhan X. Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2017, 40(11): 1611–1619. doi:10.1007/s00449-017-1817-8.

13. Moya Ramírez I., Tsaousi K., Rudden M., Marchant R., Jurado Alameda E., García Román M., Banat I. M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 231–236. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.012.

14. Varjani S. J., Upasani V. N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*. 2016, 221: 510–516. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.080.

15. Li Z., Zhang Y., Lin J., Wang W., Li S. High-Yield Di-Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its Potential Application in MEOR. *Molecules*. 2019, 24(7): 1433. doi:10.3390/molecules24071433.

16. Zhao F., Shi R., Ma F., Han S., Zhang Y. Oxygen effects on rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-0888-9.
17. Wadekar S. D., Kale S. B., Lali A. M., Bhowmick D. N., Pratap A. P. Utilization Of Sweetwater As A Cost-Effective Carbon Source For Sophorolipids Production By *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 42(2): 125–142. doi:10.1080/10826068.2011.577883.
18. Ashby R. D., Solaiman D. K. The influence of increasing media methanol concentration on sophorolipid biosynthesis from glycerol-based feedstocks. *Biotechnology Letters*. 2010, 32(10): 1429–1437.
19. Bajaj V. K., Annapure U. S. Castor Oil as Secondary Carbon Source for Production of Sophorolipids Using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. *Journal of Oleo Science*. 2015, 64(3): 315–323. doi:10.5650/jos.ess14214.
20. Biniarz P., Coutte F., Gancel F., Łukaszewicz M. High-throughput optimization of medium components and culture conditions for the efficient production of a lipopeptide pseudofactin by *Pseudomonas fluorescens* BD5. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17(1). doi:10.1186/s12934-018-0968-x.
21. Phulpoto I. A., Yu Z., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J., Qazi M. A. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-01402-4.
22. Motley J. L., Stamps B. W., Mitchell C. A., Thompson A. T., Cross J., You J., Cichewicz R. H. Opportunistic Sampling of Roadkill as an Entry Point to Accessing Natural Products Assembled by Bacteria Associated with Non-anthropoidal Mammalian Microbiomes. *Journal of Natural Products*. 2016, 80(3): 598–608. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00772.
23. Fadhile Almansoori A., Abu Hasan H., Idris M., Sheikh Abdullah S. R., Anuar N., Musa Tibin E. M. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design

(CCD). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017, 47: 272–280. doi:10.1016/j.jiec.2016.11.043.

24. Etchegaray A, Coutte F, Chataigné G, Béchet M, Dos Santos RH, Leclère V, et al. Production of *Bacillus amyloliquefaciens* OG and its metabolites in renewable media: valorisation for biodiesel production and p-xylene decontamination. *Canadian Journal of Microbiology*. 2017; 63(1):46–60. doi:10.1139/cjm-2016-0288.

25. Salazar-Bryam A. M., Lovaglio R. B., Contiero J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects. *Heliyon*. 2017, 3(6): e00337. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00337.

26. Silva S. N. R. L., Farias C. B. B., Rufino R. D., Luna J. M., Sarubbo L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 79(1): 174–183. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.03.050.

27. de Sousa J.R., da Costa Correia J.A., de Almeida J.G.L., Rodrigues S., Pessoa O.D.L., Melo V.M.M., Goncalves L.R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry*. 2011, 46(9): 1831–1839.

28. Bezerra K. G. O., Gomes U. V. R., Silva R. O., Sarubbo L. A., Ribeiro E. The potential application of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* TGC01 using crude glycerol on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Biodegradation*. 2019. doi:10.1007/s10532-019-09883-w.

29. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Uemura S., Iwabuchi H., Kitamoto D. Efficient Production of Acid-Form Sophorolipids from Waste Glycerol and Fatty Acid Methyl Esters by *Candida floricola*. *Journal of Oleo Science*. 2018, 67(4): 489–496. doi:10.5650/jos.ess17219.

30. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2007, 104(1): 78–81. doi:10.1263/jbb.104.78.

31. Liu Y., Koh C.M., Ji L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(4): 3927–3933.
32. Zhou D., Hu F., Lin J., Wang W., Li S. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d -/l -leucine. *Microbiologyopen*. 2019: 794. doi:10.1002/mbo3.794.
33. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Mashchenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMVB-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food and bioproducts processing*. 2015, 93:11–18.
34. Пирог Т.П., Гейченко Б.С., Шевчук Т.А., Мучник Ф.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин актинобактеріями роду *Rhodococcus*. *Мікробіологічний журнал*. 2020, 82 (2): 67-81.
35. Nurfarahin A., Mohamed M., Phang L. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview. *Molecules*. 2018, 23(5): 1049. doi:10.3390/molecules23051049.
36. Chong H., Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*. 2017, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0753-2.
37. Singh P., Patil Y., Rale V. Biosurfactant Production: Emerging Trends and Promising Strategies. *Journal of Applied Microbiology*. 2018, 126, 2-13. doi:10.1111/jam.14057.
38. Das P., Mukherjee S., Sen R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*. 2009, 100(2): 1015–1019. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.015.
39. Deepak R., Jayapradha, R. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. *Journal de Mycologie Médicale*. 2015, 25(1):15–24. doi:10.1016/j.mycmed.2014.10.011.

40. Singh A., Rautela R., Cameotra S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13(1): 67. doi:10.1186/1475-2859-13-67.
41. Ndlovu T., Rautenbach M., Vosloo J. A., Khan S., Khan W. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*. 2017, 7(1). doi:10.1186/s13568-017-0363-8.
42. Havenga B., Ndlovu T., Clements T., Reyneke B., Waso M., Khan W. Exploring the antimicrobial resistance profiles of WHO critical priority list bacterial strains. *BMC Microbiology*. 2019, 19(1). doi:10.1186/s12866-019-1687-0.
43. Elkhawaga M. A. Optimization and characterization of biosurfactant from *Streptomyces griseoplanus* NRRL-ISP5009 (MS1). *Journal of Applied Microbiology*. 2018, 124(3): 691–707. doi:10.1111/jam.13665.
44. Clements T., Ndlovu T., Khan W. Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. *Microbiological Research*. 2019, 229. doi:10.1016/j.micres.2019.126329.
45. Su C., Xiang Z., Liu Y., Zhao X., Sun Y., Li Z., Zhao F. Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantfaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. *BMC Genomics*. 2016, 17(1). doi:10.1186/s12864-016-3171-7.
46. Pirog T. P., Lutsay D. A., Kliuchka L. V., Beregova K. A. Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta*. 2019, 12(1): 30-57.
47. Buonocore C., Tedesco P., Vitale G.A., Esposito F. P., Giugliano R., Monti M. C., D'Auria M. V., de Pascale D. Characterization of a New Mixture of Mono-Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas gessardii* Isolated from Edmonson Point (Antarctica). *Marine Drugs*. 2020, 18: 269; doi:10.3390/md18050269.
48. Alvionita M., Hertadi, R. Bioconversion of glycerol to biosurfactant by halophilic bacteria *Halomonas elongata* BK-AG18. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2019, 19: 48–57.

49. Sen S., Borah S. N., Bora A., Deka S. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Biotechnology Reports*. 2020, 27: e00516. doi:10.1016/j.btre.2020.e00516.
50. Perneel M., D'hondt L., De Maeyer K., Adiobo A., Rabaey K., Höfte M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environmental Microbiology*. 2008, 10(3): 778–788. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01501.x .
51. Goswami D., Borah S. N., Lahkar J., Handique P. J., Deka S. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. *Journal of Basic Microbiology*. 2015, 55(11): 1265–1274. doi:10.1002/jobm.201500220.
52. Mouafo T. H., Mbawala A., Ndjouenkeu R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed Research International*. 2018: 1–15. doi:10.1155/2018/5034783.
53. Bharali P., Singh S. P., Dutta N., Gogoi S., Bora L. C., Debnath P., Konwar B. K. Biodiesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*. 2014, 4(73): 38698–38706. doi:10.1039/c4ra05594b.
54. Chebbi A., Elshikh M., Haque F., Ahmed S., Dobbin S., Marchant R., Banat I. M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*. 2017, 57(5): 364–375. doi:10.1002/jobm.201600658.
55. Пирог Т. П., Луцай Д. А., Шевчук Т. А., Іутинська Г. О., Ельперін І. В. Антимікробна та антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на технічному гліцерині. *Мікробіологічний журнал*. 2018, 80(2):14-27.

56. Пирог Т. П., Никитюк Л. В., Іутинська Г. О. Біологічні властивості поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на відходах виробництва біодизелю. *Мікробіологічний журнал*. 2016, 78(5): 12-20.

57. Пирог Т. П., Петренко Н. М., Палійчук О. І. Дія на мікроорганізми поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на промислових відходах. *Наукові праці НУХТ*. 2020, 26 (3): 60-69.

58. Kuyukina M, Ivshina I, Korshunova I, Stukova G, Krivoruchko A. Diverse effects of a biosurfactant from *Rhodococcus ruber* IEGM 231 on the adhesion of resting and growing bacteria to polystyrene. *AMB Express*. 2016; 6 (14). doi: 10.1186/s13568-016-0186-z.

59. Janek T, Krasowska A, Czyżnikowska Ż, Łukaszewicz M. Trehalose lipid biosurfactant reduces adhesion of microbial pathogens to polystyrene and silicone surfaces: an experimental and computational approach. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9:2441. doi: 10.3389/fmicb.2018.02441.

60. Li C., Zhou Z.X., Jia X.Q., Chen Y., Liu J., Wen J.P. Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 171(7):1715–25. doi:10.1007/s12010-013-0451-4.

61. Cheffi M., Hentati D., Chebbi A., Mhiri N., Sayadi S., Marqués A. M., Chamkha M. Isolation and characterization of a newly naphthalene-degrading *Halomonas pacifica*, strain Cnaph3: biodegradation and biosurfactant production studies. *3 Biotech*. 2020, 10(3). doi:10.1007/s13205-020-2085-x.

62. Jimoh A. A., Lin J. Enhancement of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Production Through the Optimization of Medium Composition and Its Application for Biodegradation of Hydrophobic Pollutants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018. doi:10.1007/s12010-018-2847-7.

63. Hasani zadeh P., Moghimi H., Hamed J. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides*: Environmental applications and surface-active properties. *Engineering in Life Sciences*. 2018, 18(5): 317–325. doi:10.1002/elsc.201700149.

64. Madihalli C., Sudhakar H., Doble M. Production and investigation of the physico-chemical properties of MEL-A from glycerol and coconut water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020, 36(6). doi:10.1007/s11274-020-02857-8.
65. Sousa M., Melo V. M. M., Rodrigues S., Sant'ana H. B., Gonçalves L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus strains* using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2012, 35(6): 897–906. doi:10.1007/s00449-011-0674-0.
66. Wu J., Zhang J., Wang P., Zhu L., Gao M., Zheng Z., Zhan X. Production of rhamnolipids by semi-solid-state fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* RG18 for heavy metal desorption. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2017, 40(11): 1611–1619. doi:10.1007/s00449-017-1817-8.
67. El-Housseiny G. S., Aboshanab K. M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A. Structural and Physicochemical Characterization of Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* P6. *AMB Express*. 2020, 10: 201. doi:10.1186/s13568-020-01141-0.
68. Phulpoto I. A., Yu Z., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J., Qazi M. A. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial Cell Factories*. 2020, 19(1). doi:10.1186/s12934-020-01402-4.
69. Vilela W. F. D., Fonseca S. G., Fantinatti-Garboggini F., Oliveira V. M., Nitschke M. Production and Properties of a Surface-Active Lipopeptide Produced by a New Marine *Brevibacterium luteolum* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 174(6): 2245–2256. doi:10.1007/s12010-014-1208-4.
70. Li Z., Zhang Y., Lin J., Wang W., Li S. High-Yield Di-Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* YM4 and its Potential Application in MEOR. *Molecules*. 2019, 24(7): 1433. doi:10.3390/molecules24071433.

71. Пирог Т. П., Савенко И. В., Шевчук Т. А. Влияние условий культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ. *Мікробіологічний журнал*. 2016, 78 (1): 2-12.

72. Smith E.L., Austen B.M., Blumenthal K.M., Nyc J.F. 5 Glutamate Dehydrogenases. *The Enzymes*. 1975, 11: 293–367.

73. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72 (3): 248–254.

74. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959, 37(8): 911–917

75. Chebbi A., Elshikh M., Haque F., Ahmed S., Dobbin S., Marchant R., Sayadi S., Chamkha M., Banat I.M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*. 2017; 57(5): 364–375. doi: 10.1002/jobm.201600658.

76. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011; 84(1):1–5. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.045.

77. Gomes M.-Z.V., Nitschke M.. Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. *Letters in Applied Microbiology*. 2012; 49(1): 960–965.

78. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko E.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009; 45(3): 272–8. doi:10.1134/S0003683809030065.

79. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter*

calcoaceticus IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food and Bioproducts Processing*. 2015; 93(1): 11–8.

80. Giri S. S., Ryu E., Sukumaran V., Chang Park S. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus strains*. *Microbial Pathogenesis*. 2019. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.035.

81. De Rienzo M. A. D., Martin P. J. Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms Pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Current Microbiology*. 2016, 73(2): 183–189. doi:10.1007/s00284-016-1046-4.

82. Stierle A.A., Stierle D.B., Decato D., Priestley N.D., Alverson J.B., Hoody J. The berkeleylactones, antibiotic macrolides from fungal coculture. *Journal of Natural Products*. 2017, 80(4): 1150–1160. doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00133.

83. Matevosyan, L., Bazukya, I., Trchounian, A. (2019). Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BMC Microbiology*, 19 (1), 46–63. doi: 10.1186/s12866-019-1475-x.

84. Luti K.J.K., Yonis R.W. Elicitation of *Pseudomonas aeruginosa* with live and dead microbial cells enhances phenazine production. *Romanian Biotechnological Letters*. 2013, 18 (6): 8769–8778.

85. Rateb M.E., Hallyburton I., Houssen W.E., Bull A.T., Goodfellow M., Santhanam R., Jaspars M., Ebel R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances*. 2013, 3(34): 14444. doi:10.1039/c3ra42378f.

86. Wang D., Yuan J., Gu S., Shi Q. Influence of fungal elicitors on biosynthesis of natamycin by *Streptomyces natalensis* HW-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(12): 5527–5534. doi: 10.1007/s00253-013-4786-0.

87. Abdel-Wahab N.M., Scharf S., Ozkaya F.C., Kurtan T., Mandi A., Fouad M.A., Kamel M.S. Induction of secondary metabolites from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* through co-cultivation with *Bacillus subtilis*. *Planta Medica*. 2019, 85 (6): 503–512. doi: 10.1055/a-0835-2332.

88. Buijs Y., Zhang S.D., Jørgensen K.M., Isbrandt T., Larsen T.O., Gram L. Enhancement of antibiotic production by co-cultivation of two antibiotic producing marine *Vibrionaceae* strains. *FEMS Microbiology Ecology*. 2021, 97(4): fiab041. doi: 10.1093/femsec/fiab041.

89. Liang L., Sproule A., Haltli B., Marchbank D.H., Berru  F., Overy D.P., McQuillan K., Lanteigne M., Duncan N., Correa H., Kerr R.G. Discovery of a new natural product and a deactivation of a quorum sensing system by culturing a "producer" bacterium with a heat-killed "inducer" culture. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 9: 3351. doi: 10.3389/fmicb.2018.03351.

90. 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. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005, 41(1): 51–55. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0010-z>.

91. Liang L., Wang G., Haltli B., Marchbank D.H., Stryhn H., Correa H., Kerr R.G. Metabolomic comparison and assessment of co-cultivation and a heat-killed inducer strategy in activation of cryptic biosynthetic pathways. *Journal of Natural Products*. 2020, 83(9): 2696–2705. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00621.

92. Gomez N.C., Ramiro J.M., Quecan B.X., Melo Franco B.D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 863.

93. Kimelman H., Shemesh M. Probiotic bifunctionality of *Bacillus subtilis*—rescuing lactic acid bacteria from desiccation and antagonizing pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*. 2019, 7: 407. doi: 10.3390/microorganisms7100407.

94. Hamza F., Kumar A.R., Zinjarde S. Coculture induced improved production of biosurfactant by *Staphylococcus lentus* SZ2: Role in protecting *Artemia salina* against *Vibrio harveyi*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2018, 114: 33–39. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.03.008.

95. Mohamed S.H., Hossam M., Mohammed R., Mohamed M.F., Ahmed S.M., Ahmed A.H., Sameh F.A., Mostafa E.R., Hani A.A., Ramadan A.U. Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*. 2020, 18(5): 243. doi:10.3390/md18050243.

Апробація результатів науково-дослідної роботи**Нагороди:**

1. Переможець студентських наукових проектів за благодійної підтримки Корпорації «Артеріум» (17 червня 2021 р.).
2. Диплом I ступеня II туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» по секції «Фармацевтична та молекулярна біотехнологія» 2020/2021 н.р.

Статті у фахових журналах:

1. Pirog T.P., Piatetska D.V., Yarova H.A., Iutynska G.O. Effect on phytopathogenic microorganisms of surfactants of microbial origin. *Mikrobiol. Z.* 2021; 83(6):75-94.
2. Pirog T.P., Lutsai D., Yarova H.A. Regulation of biological activity of surfactants under cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 on glycerol. *Ukrainian Food Journal.* 2022. 11 (1).

Статті у збірниках міжнародних конференцій за межами України:

1. Иванов Н.С., Ярова А.А., Пирог Т.П. Влияние конкурентных микроорганизмов на биологическую активность поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 //Международная научно-практическая Online-Offline конференция «Биотехнология: достижения и перспективы развития» (25-26 ноября 2021 г., Пинск, Республика Беларусь) (подано до друку).

Тези у збірниках міжнародних конференцій за межами України:

1. Ярова А.А. Влияние двухвалентных катионов на антимикробную активность поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241// Сборник тезисов докладов LXXV Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2021» (г. Минск, Республика Беларусь, 14-16 апреля 2021 г). – С. 572.

2. Ярова А.А. Влияние катионов кальция на биологическую активность поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 // 106-й Международная научно-практическая конференция студентов и магистрантов «Студенты – науке и практике АПК» (г. Витебск, Республика Беларусь, 21 мая 2021 г.).

Тези у збірниках міжнародних конференцій в Україні:

1. Ярова Г.А. Вплив катіонів кальцію у середовищі з гліцерином на здатність поверхнево-активних *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 руйнувати біоплівки // Збірник матеріалів VIII Міжнародної науково-практичної конференції «Хімія, біо- і нанотехнології, екологія та економіка в харчовій і косметичній промисловості» (м. Харків, 26-27 листопада 2020 р.). – С. 42-44.

2. Ярова Г.А. Вплив катіонів кальцію на антимікробну дію поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих на відходах виробництва біодизелю // Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 26 листопада 2020 р.). – С. 530-531.

3. Ярова Г.А., Пирог Т.П. Вплив двовалентних катіонів на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 // Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів «Topical issues of new medicines development» (Харків, 18-19 березня 2021 р.). – С. 241-242.

4. Ярова Г.А., Пирог Т.П. Деструкція біоплівок за дії поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих у середовищі з різною концентрацією катіонів кальцію // Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (Харків, 25 березня 2021 р.). – С. 362-363.

5. Ярова Г.А., Пирог Т.П. Здатність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 за наявності біологічних

індукторів, до деструкції біоплівки // Матеріали VI Міжнародної науковопрактичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 11-12 листопада 2021 р.). – С. 528-529.

Тези у збірниках Всеукраїнських конференцій:

1. Ярова Г.А. Біологічна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності двовалентних катіонів // Матеріали XV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (м. Київ, 23 квітня 2021 р.). – С. 112.

2. Г.А. Ярова, Т.П. Пирог Вплив біологічних індукторів на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241// Біологічні процеси оптимізації продукційного процесу культурних рослин: матеріали Всеукраїнської науково-практичної онлайн-конференції, присвяченої 60-річчю ІСМАВ НААН (м. Чернігів, 26–27 жовтня 2021 р.). – С. 46-48.

Тези у збірниках студентських конференцій НУХТ:

1. Ярова Г.А., Пирог Т. П. Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих у середовищі з гліцерином за наявності катіонів кальцію // Програма та тези матеріалів ІХ Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 10-11 листопада 2020 р.) – С. 41-42.

2. Ярова Г., Пирог Т. Антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих за наявності у середовищі з гліцерином катіонів кальцію // Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м. Київ, НУХТ, 15-16 квітня 2021 р.). – С. 427.

3. Іванов М.С., Пирог Т.П., Ярова Г.А. Вплив біологічних індукторів на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus*

ІМВ В-7241 // Програма та тези матеріалів Х Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 09-10 листопада 2021 р.). – С. 22-24.

4. Пирог Т.П., Ярова Г.А., Луцай Д.А. Вплив катіонів кальцію на біологічну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині // Програма та тези матеріалів Х Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 09-10 листопада 2021 р.). – С. 48-49.

5. Ярова Г.А., Пирог Т.П. Антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів // Програма та тези матеріалів Х Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (м. Київ, НУХТ, 09-10 листопада 2021 р.). – С. 50-52.

Тези у збірниках школи молодих науковців АТ "Фармак":

1. Ярова Г.А. Регуляція біологічної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині// Матеріали ІХ Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ "Фармак" (29 жовтня 2021 р.). – С. 75-77.

2. Ярова Г.А. Вплив бактерій роду *Bacillus* на антимікробну активність поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241// Матеріали ІХ Науково-практичної конференції з міжнародною участю Школи молодих науковців АТ "Фармак" (29 жовтня 2021 р.). – С. 77-79.