

ВПЛИВ ОДНОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ НА СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Т.П. Пирог^{1,2}, Л.В. Ключка¹, Т.А. Шевчук², Г.О. Іутинська²

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

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

Мета. Дослідження синтезу та біологічних властивостей поверхнево-активних речовин (ПАР), синтезованих *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з різним вмістом катіонів калію та натрію. **Методи.** Штам IMB B-7405 вирощували у середовищі з гліцерином. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини модифікованою сумішшю Фолча. Антиадгезивну активність та ступінь деструкції біоплівки визначали спектрофотометричним методом, антимікробну активність – за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Активність ферментів біосинтезу ПАР аналізували у безклітинних екстрактах, одержаних після руйнування клітин ультразвуком. **Результати.** Додаткове внесення 0,5–1,0 г/л хлориду натрію, хлориду калію чи їх суміші у середовище культивування штаму IMB B-7405 супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були відповідно в 2–125 і 2–30 разів нижчими, адгезія бактерій на абіотичних матеріалах, оброблених такими ПАР, в 1,1–1,6 разів нижчою, а ступінь руйнування дріжджових біоплівок на 25–48 % вищою порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на базовому середовищі. Антимікробна та антиадгезивна активність ПАР корелювала з НАДФ⁺-залежною глутаматдегідрогеназною активністю (ключовий фермент біосинтезу аміноліпідів – найефективніших антимікробних агентів серед поверхнево-активних речовин). Підвищення в 1,2 рази (до 5,6 г/л) концентрації ПАР за умов росту штаму IMB B-7405 у середовищі з 1,0 г/л хлориду натрію зумовлене посиленням синтезу гліколіпідів, про що засвідчило збільшення в 1,6 разів ФЕП-синтезної активності (ключовий фермент глюконеогенезу) порівняно з показниками на базовому середовищі. **Висновки.** Одержані дані засвідчують можливість підвищення антимікробної та антиадгезивної активності мікробних ПАР зміною у середовищі культивування продуцента вмісту катіонів – потенційних активаторів ключових ферментів біосинтезу складових ПАР, відповідальних за ці біологічні властивості.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* MB B-7405, поверхнево-активні речовини, катіони калію та натрію, антимікробні та антиадгезивні властивості, біосинтез.

Нині мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) завдяки їх емульгувальним властивостям, здатності знижувати поверхневий натяг та високій антимікробній, антиадгезивній активності та здатності руйнувати біоплівки є об'єктами інтенсивних досліджень [1–4]. Проте у різних умовах культивування склад та властивості мікробних ПАР можуть змінюватися.

Так, у попередніх дослідженнях було встановлено залежність антимікробної та антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* ІМВ В-7405 від природи джерела вуглецю (гліцерин, соняшникова олія), ступеня очищення (очищений гліцерин та відходи виробництва біодизелю) та якості субстрату (відпрацьована соняшникова олія після смаження м'яса, картоплі фрі) [5–7].

Зазначимо, що у літературі наявні повідомлення про можливість регуляції антимікробної активності мікробних ПАР лише хімічним шляхом [8] або в результаті вдосконалення штамів-продуцентів генетичною [9] або метаболічною [10] інженерією.

Результати наших досліджень [11] показали, що існує простіший і не менш ефективний спосіб регуляції біологічних властивостей ПАР в процесі культивування продуцента на модифікованому середовищі, що містить активатори ферментів, відповідальних за синтез компонентів комплексу поверхнево-активних речовин з певними необхідними властивостями.

Так, у *N. vaccini* ІМВ В-7405 [12] ключовим ферментом біосинтезу аміноліпідів, відповідальних за антимікробну активність ПАР, є НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа, активаторами якої є катіони кальцію. Підвищення концентрації активаторів у середовищі культивування продуцента супроводжувалося підвищенням антимікробної активності синтезованих ПАР. Пізніше було показано, що окрім Ca²⁺ активаторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vaccini* ІМВ В-7405 є одновалентні катіони [6].

У зв'язку з цим мета даної роботи – дослідження синтезу та біологічних властивостей поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccini* ІМВ В-7405 на середовищі з різним вмістом катіонів калію та натрію.

Матеріали і методи. Основним об'єктом досліджень був виділений нами з забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccini* К-8 [13]. Штам К-8 зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7405.

Як тест-культури під час визначення антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, а також їх ролі у руйнуванні біоплівки використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1) і дріжджів (*Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccini ІМВ В-7405 вирощували у рідкому середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ – 0,5; MgSO₄×7H₂O – 0,1; CaCl₂×2H₂O – 0,1; KH₂PO₄ – 0,1; FeSO₄×7H₂O – 0,01, дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка) (**базове середовище**). Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали також у базовому середовищі, в яке додатково вносили KCl (0,5 та 1,0 г/л), NaCl (0,5 та 1,0 г/л) та суміш цих солей (0,5 г/л KCl та 0,5 г/л NaCl) (**модифіковані середовища**). Як джерело вуглецю використовували очищений гліцерин у концентрації 1 % (об'ємна частка).

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

Культивування здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 5 діб.

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований нами метод Блайя і Дайєра [14], після екстракції їх сумішню хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв.

Оскільки *N. vaccinii* IMB B-7405 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а відомий метод Блайя і Дайєра [14], що використовується для виділення ПАР, дає змогу виділяти в основному неполярні ліпіди, ми модифікували класичну систему розчинників (суміш Фолча) додаванням до неї 1 М HCl (хлороформ – метанол – вода = 4:3:2). Така система дозволяє максимально повно 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 шліфованою пробкою і струшували 3 хв, потім додавали 15 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшували (екстрагування ліпідів) протягом 5 хв. Отриману 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 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів, як описано нами раніше [6, 7]. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній.

Визначення антиадгезивної активності ПАР здійснювали, як описано у роботі [5]. Кількість адгезованих клітин (ступінь адгезії) визначали спектрофотометричним методом як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР матеріалів (кахель, сталь, лінолеум), до оптичної густини контрольних зразків (без обробки ПАР) і виражали у відсотках.

Дослідження впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали, як описано у роботі [15]. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл МПБ чи рідкого сусла та 20 мкл суспензії однодобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год за оптимальною для тест-культури температурою, після чого зливали культуральну рідину і вносили 180 мкл свіжого МПБ чи сусла і 20 мкл суспензії тест-культури і ще інкубували впродовж 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 варіанти (лунки) замість препаратів ПАР вносили стерильну водопровідну воду (200 мкл). Через 24 год експозиції лунки тричі промивали 200 мкл дистильованої води і визначали кількість адгезованих клітин спектрофотометричним методом. Ступінь руйнування біоплівки (%) визначали як різницю між адгезією клітин у необроблених і оброблених ПАР лунках полістиролового планшета.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину центрифугували (5000 g, 20 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М K^+ -фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв, 4 °C). Відмиті клітини ресуспендували в 0,05 М K^+ -фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнували ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 °C), осад відділяли, а супернатант використовували для подальших досліджень як безклітинний екстракт.

Активність ферментів визначали, як описано у нашій праці [12]. Активність фосфоенолпіруват(ФЕП)-синтетази (КФ 2.7.9.2) встановлювали за швидкістю утворення пірувату, яку аналізували за окисненням НАДН при 340 нм в спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксікінази (КФ 4.1.1.49) – за утворенням ФЕП та пірувату у процесі окиснення НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) – за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм.

Активність ферментів виражали в нмоль одержаного за 1 хв продукту реакції у перерахунку на 1 мг білка. Вміст білка у безклітинних екстрактах визначали за Bradford [16]. Активність ферментів аналізували при 28–30 °C – температурі, оптимальній для росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у попередніх роботах [5–7]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати. У табл. 1 наведено дані щодо синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на модифікованих середовищах 1–5 з різним вмістом одновалентних катіонів. Встановлено, що внесення хлориду натрію в концентрації 0,5 та 1,0 г/л у середовище дало змогу підвищити концентрацію синтезованих ПАР до 5,6–5,7 г/л.

На наступному етапі аналізували активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- (НАДФ⁺-глутаматдегідрогеназа) та гліколіпідів (ФЕП-синтетаза та ФЕП-карбоксікінази) під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у середовищі з різним вмістом одновалентних катіонів (табл. 2).

Таблиця 1

**Вплив одновалентних катіонів у середовищі культивування
N. vaccinii ІМВ В-7405 на синтез поверхнево-активних речовин**

Середовище	Вміст у середовищі, г/л		Концентрація синтезованих ПАР, г/л
	NaCl	KCl	
Базове	0	0	4,6±0,23
№ 1	0	0,5	4,4±0,22
№ 2	0	1,0	4,5±0,23
№ 3	0,5	0	5,7±0,29
№ 4	1,0	0	5,6±0,28
№ 5	0,5	0,5	4,5±0,23

Таблиця 2

Активність ферментів біосинтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищах різного складу

Середовище культивування	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білку)		
	НАДФ ⁺ -глутамат-дегідрогенази	ФЕП-синтетази	ФЕП-карбоксікінази
Базове	1316±66	32895±1645	2632±132
№ 2	2581±129	37179±1859	1282±68
№ 4	2571±129	52564±2628	5128±256
№ 5	3871±194	44872±2244	1282±64

Примітка: склад модифікованих середовищ № 2, 4 та 5 наведено у табл. 1.

За наявності у середовищі 1,0 г/л хлориду калію, натрію чи їх суміші спостерігали збільшення майже у 2–3 рази активності НАДФ⁺-глутамат-дегідрогенази та в 1,1-1,6 разів активності ФЕП-синтетази порівняно з показниками на базовому середовищі. У той же час активність ФЕП-карбоксікінази була майже у два рази вищою, ніж на базовому середовищі, тільки під час вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищі 4, що містило 1,0 г/л хлориду натрію.

Дані щодо мінімальних інгібуючих концентрацій ПАР, одержаних на базовому та модифікованих середовищах, наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив одновалентних катіонів у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на антимікробну активність синтезованих ПАР

Тест-культура	МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих на середовищі					
	базовому	№1	№2	№3	№4	№5
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	100	3,13	0,8	12,5	50	6,25
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	50	0,8	6,25	3,2	25	12,5
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	100	1,6	12,5	25	50	25
<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	100	12,5	50	12,5	Н.в.	3,12
<i>Candida tropicalis</i> РЕ-2	25	1,6	3,13	12,5	25	6,25
<i>Candida albicans</i> Д-6	50	12,5	12,5	12,5	50	12,5
<i>Candida utilis</i> БВС-65	25	0,8	1,6	6,25	25	12,5

Примітки: склад модифікованих середовищ № 1–5 наведено у табл. 1. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %. Н.в. – не визначали.

Ці результати засвідчують, що додаткове внесення у середовище хлориду калію, натрію чи їх суміші супроводжувалося синтезом ПАР, антимікробна активність яких щодо бактерій була у 2–125 разів, а щодо дріжджів – у 2–30 разів вищою, ніж поверхнево-активних речовин, утворених на базовому середовищі. Зазначимо, що мінімальні інгібуючі концентрації щодо усіх досліджуваних дріжджових тест-культур ПАР, синтезованих на базовому середовищі і середовищі 4, були однаковими (25–50 мкг/мл).

У табл. 4. наведено дані щодо адгезії бактеріальних тест-культур на матеріалах, попередньо оброблених розчинами ПАР, синтезованих на середовищі з різним вмістом одновалентних катіонів.

Таблиця 4

Адгезія бактерій на абіотичних поверхнях, оброблених розчинами ПАР, синтезованих в різних умовах культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Тест-культура	Середовище культивування	Адгезія, %			
		пластик	кахель	сталь	лінолеум
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	Базове*	41,4	43,2	30,7	23,6
	№1	28,4	29,8	20,4	20,6
	№2	30,2	30,5	21,4	19,8
	№3	31,4	31,9	22,1	21,4
	№4	35,7	32,4	23,2	21,5
	№5	30,2	32,4	23,5	22,0
<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (спори)	Базове*	41,3	41,6	42,5	30,6
	№1	31,2	30,5	29,2	22,4
	№2	34,2	32,0	30,4	23,7
	№3	32,1	32,4	31,5	25,1
	№4	35,0	35,2	40,6	27,1
	№5	30,3	35,2	32,4	24,5
<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	Базове*	37,5	39,1	35,2	38,2
	№1	22,4	25,5	23,1	21,0
	№2	23,2	27,4	24,6	23,4
	№3	25,3	26,2	22,1	22,5
	№4	30,8	29,2	27,5	27,5
	№5	28,5	27,6	26,2	25,3

Примітки: склад модифікованих середовищ № 1–5 наведено у табл. 1. Під час визначення адгезії похибка не перевищувала 5 %. Концентрація розчинів ПАР – 6,2 мкг/мл, * – концентрація розчинів ПАР – 25 мкг/мл.

Встановлено, що ПАР, отримані на модифікованих середовищах, виявилися ефективнішими антиадгезивними агентами, ніж синтезовані на базовому середовищі. Так, у разі обробки абіотичних матеріалів розчинами таких поверхнево-активних речовин з концентрацією всього 6,25 мкг/мл адгезія бактерій була в 1,1–1,6 разів нижчою, ніж після обробки поверхонь синтезованими на базовому середовищі ПАР з вищою у 4 рази концентрацією (25 мкг/мл).

У табл. 5 наведено дані щодо деструкції дріжджових біоплівки за дії ПАР, отриманих на базовому та модифікованих середовищах. Дослідження показали, що внесення як катіонів калію, так і натрію у середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 супроводжувалося синте-

зом ПАР, які за низьких концентрацій (12,5 мкг/мл) руйнували на 50–76 і 47–58 % біоплівки *C. albicans* Д-6 і *C. utilis* БВС-65 відповідно. Зазначимо, що деструкція дріжджових біоплівок за наявності аналогічної концентрації ПАР, синтезованих на базовому середовищі, становила всього 21–28 % (табл. 5). Аналогічні закономірності спостерігалися й у разі зниження концентрації ПАР у 2 та 4 рази (до 3,1–6,2 мкг/мл).

Таблиця 5

Руйнування дріжджових біоплівок за дії ПАР, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищах з різним вмістом одновалентних катіонів

Середовище культивування	Руйнування біоплівки (%)	
	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Candida utilis</i> БВС-65
Базове	28,4	21
№1	60,5	55,1
№2	76,8	57,4
№3	73,0	53,5
№4	51,4	46,5
№5	64,4	58,5

Примітки: склад модифікованих середовищ 1–5 наведено у табл. 1. Концентрація розчинів ПАР – 12,5 мкг/мл. Під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

Обговорення. Результати, наведені у даній статті, є логічним продовженням і підтвердженням наших попередніх досліджень [11, 12, 17] про можливість підвищення антимікробної і антиадгезивної активності мікробних ПАР в процесі культивування продуцента на модифікованому середовищі, що містить активатори ферментів, відповідальних за синтез компонентів комплексу поверхнево-активних речовин з певними необхідними властивостями.

У роботах [11, 12, 17] нами було встановлено, що активаторами НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази – ключового ферменту біосинтезу поверхнево-активних аміноліпідів у *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 – є катіони кальцію (5 мМ), магнію (10 мМ) і цинку (0,001–0,01 мМ), *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 – кальцію (5 мМ), *N. vaccinii* ІМВ В-7405 – кальцію (5 та 10 мМ). За підвищеної концентрації у середовищі культивування активаторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази синтезувалися ПАР, антимікробна та антиадгезивна активність яких, а також здатність до руйнування біоплівок була вищою, ніж поверхнево-активних речовин, одержаних на базових середовищах.

При цьому підвищення антимікробної та антиадгезивної активності ПАР, синтезованих за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на модифікованих середовищах [11, 12, 17], не супроводжувалося збільшенням концентрації поверхнево-активних речовин порівняно з такою на базовому середовищі.

Тому результати, наведені у даній статті про підвищення синтезу ПАР у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищах 3 і 4, в які додатково вносили хлорид натрію, виявилися для нас дещо неочікуваними.

ми (табл. 1). Для з'ясування можливих причин цього явища аналізували активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) та гліколіпідів (ФЕП синтетаза та ФЕП-карбоксікіназа) за умов росту штаму ІМВ В-7405 на базовому та модифікованих середовищах. Дані, наведені у табл. 2, засвідчили про те, що під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на модифікованих середовищах підвищувалася активність не тільки НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази, а й активність ФЕП-синтетази, а на середовищі 4 – ще й і ФЕП-карбоксікінази. Таким чином, катіони натрію є активаторами ферментів глюконеогенезу у *N. vaccinii* ІМВ В-7405, а отже, збільшення концентрації ПАР у процесі вирощування штаму на модифікованих середовищах 3 і 4 може бути зумовлене посиленням синтезу за таких умов поверхнево-активних гліколіпідів (табл. 1 і 2).

Позитивний вплив катіонів натрію на синтез ПАР за умов росту штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гексадекані було встановлено нами у попередніх дослідженнях [18]. Проте у *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 катіони натрію виявилися активаторами ферментів катаболізму ростового субстрату (алкангідроксилази і НАДФ⁺-залежної альдегіддегідрогенази).

Зазначимо, що на момент публікації роботи [18] у літературі були відсутні дані про можливість збільшення синтезу ПАР за рахунок підвищення вмісту у середовищі культивування одновалентних катіонів, які є активаторами або ферментів катаболізму субстрату, або біосинтезу цільового продукту. Нещодавно з'явилися повідомлення про вплив катіонів калію на синтез поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* АТСС 4277 [19] та натрію – *Nocardiosis* sp. В4 [20], *Halomonas meridiana* ВК-АВ4 [21]. Так, підвищення концентрації калію фосфату у середовищі культивування *R. erythropolis* АТСС 4277 з 30 до 150 ммоль/л супроводжувалося збільшенням концентрації синтезованих ПАР з 52 до 285 мг/л. Під час проведення цих досліджень автори роботи [19] посилалися на літературні дані [22] про активуючий вплив катіонів калію на синтез ПАР штамами *R. erythropolis* і не намагалися встановити механізми, що забезпечують збільшення концентрації ПАР. У праці [20] встановлено, що у разі підвищення концентрації хлориду натрію з 3 до 12 г/л у середовищі концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих *Nocardiosis* sp. В4, збільшувалася на 80%. Під час культивування *H. meridiana* ВК-АВ4 у середовищі, що містило 7 г/л NaCl, синтезувалися ПАР, індекс емульгування (E_{24}) яких досягав 75%, у той час як на середовищі з 4 г/л хлориду натрію утворювалися поверхнево-активні речовини з нижчим показником E_{24} (55%) [21]. Зазначимо, що штами *Nocardiosis* sp. та *H. meridiana* ВК-АВ4 є галофілами, тому дослідження впливу концентрації хлориду натрію на синтез ПАР цими штамами є зрозумілим.

Разом з тим у літературі є повідомлення про вплив калію та натрію хлориду на синтез інших практично цінних метаболітів, зокрема, екзополісахаридів (ЕПС) [23, 24]. Так, збільшення з 2,0 до 4,5 г/л концентрації калію хлориду у середовищі культивування *Kocuria rosea* ZJUQH дало змогу підвищити концентрацію синтезованих ЕПС з 36,27 до 58,03 г/л [23]. Автори припускають, що позитивний вплив катіонів калію на утворення ЕПС зумовлений їх участю у генерації енергії протонрушійної сили.

У роботі [24] встановлено, що додаткове внесення 3 г/л хлориду натрію у середовище культивування продуцента пулулану *Aureobasidium pullulans* ССТСС М2012259 супроводжувалося збільшенням на 27,6 % (до 28,8 г/л) концентрації синтезованого ЕПС. Автори зазначають, що за таких умов культивування знижується рівень біомаси, а також молекулярна маса пулулану. Ймовірно, що зменшення молекулярної маси впливатиме на реологічні властивості синтезованого ЕПС, однак автори не проводили таких досліджень.

У той же час у доступній літературі нам не вдалося знайти відомості про залежність біологічної активності поверхнево-активних речовин від вмісту у середовищі культивування продуцента одновалентних катіонів. Щоправда, є інформація про те, що добавлення 875 мМ NaCl до розчину дирамноліпідів (0,375 г/л), синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* #112, супроводжувалося підвищенням антифунгальної активності [25]. За наявності тільки розчину дирамноліпідів пригнічення росту штаму *Aspergillus niger* MUM 92.13 становило 41%, а після добавлення хлориду натрію спостерігали повне його інгібування.

У роботі [26] показано, що внесення хлориду калію (0,07 μ моль/л) та інших солей (хлориду магнію та сульфату мангану) у середовище культивування *Geobacillus* sp. 15 супроводжувалося підвищенням активності синтезованого бактеріоцину щодо *Geobacillus* sp. 9A11 з 40 до 160 од/мл.

Значимо, що встановлений у даній роботі вплив одновалентних катіонів на антимікробну активність ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 був значно суттєвішим, ніж вплив двовалентних катіонів на біологічну активність як поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 [12], так і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 [11] та *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 [17]. Так, мінімальні інгібуючі концентрації ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за підвищеної концентрації у середовищі культивування катіонів кальцію, магнію, цинку, щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були в 1,2–18 разів нижчими порівняно з показниками, встановленими для ПАР, одержаних на базових середовищах [11, 12, 17]. У той же час додаткове внесення 0,5–1,0 г/л хлориду натрію, хлориду калію чи їх суміші у середовище культивування штаму ІМВ В-7405 супроводжувалося утворенням ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо бактеріальних і дріжджових тест-культур були відповідно в 2–125 і 2–30 разів нижчими, ніж МІК ПАР, синтезованих на базовому середовищі (табл. 3).

Дані, наведені у табл. 2–5, засвідчують, що антимікробна та антиадгезивна активність ПАР, синтезованих за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 у середовищах з різним вмістом одновалентних катіонів, корелювала з НАДФ⁺-залежною глутаматдегідрогеназною активністю (ключовий фермент біосинтезу аміноліпідів). Відомо, що антимікробна активність аміноліпідів є на порядки вищою, ніж гліколіпідів: мінімальні інгібуючі концентрації аміноліпідів, рамноліпідів і софороліпідів становлять в середньому (мкг/мл) 1–32, 50–500 і 10–200 відповідно [27]. Так, МІК гліколіпідів, синтезованих *Pseudomonas aeruginosa* W10, щодо *E. coli* АТСС 25922, *Staphylococcus aureus* (MRSA) АТСС 43300 та *C. albicans* АТСС 10231 становили 37,50, 9,37 і 2,34 мг/мл відповідно [28]. Гліколіпіди *Lysinibacillus* sp. BV152.1BV152.1 виявляли однаково слабку антимікроб-

ну дію на *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* DM50, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA та *S. marcescens* ATCC 27117: МІК щодо усіх тест-культур становили 500 мкг/мл [29]. Зазначимо, що мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на модифікованих середовищах (табл. 3), перебувають у межах, визначених для відомих у світі аміноліпідів [27].

Окрім цього, звертає на себе увагу наявність кореляції між концентрацією синтезованих ПАР, активністю ключових ферментів біосинтезу гліколіпідів та антимікробною активністю поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на модифікованому середовищі 4 (табл. 1–3). Так, вища концентрація ПАР зумовлена, ймовірно, більшим вмістом гліколіпідів у їх складі, в результаті чого антимікробна активність таких поверхнево-активних речовин є нижчою, ніж ПАР, синтезованих на інших модифікованих середовищах. Значення МІК поверхнево-активних речовин, отриманих на середовищі 4, щодо бактеріальних тест-культур були всього у 2 рази нижчими, а щодо дріжджових практично не відрізнялися від мінімальних інгібуючих концентрацій ПАР, синтезованих на базовому середовищі (табл. 3).

Разом з тим поверхнево-активні речовини, утворені на середовищі 4, за здатністю до деструкції біоплівки не відрізнялися від ПАР, синтезованих на інших модифікованих середовищах (табл. 5). Очевидно, що в основі руйнування біоплівки, окрім антимікробної дії, лежать і інші механізми (змінення поверхні заряду, антиадгезивна активність) [30].

Таким чином, в результаті проведеної роботи показано, що добавлення у середовище культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 одновалентних катионів супроводжувалося синтезом ПАР з вищою антимікробною та антиадгезивною активністю, ніж ПАР, одержаних на базовому середовищі.

Одержані дані узгоджуються з одержаними раніше [11, 12, 17] і засвідчують можливість регуляції антимікробної та антиадгезивної активності ПАР в процесі культивування продуцента.

ВЛИЯНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* ИМВ В-7405

Т.П. Пироз^{1,2}, Л.В. Ключка¹, Т.А. Шевчук², Г.А. Иутинская²

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Резюме

Цель. Исследование синтеза и биологических свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтезированных *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на среде с различным содержанием катионов калия и натрия. **Методы.** Штамм ИМВ В-7405 выращивали в среде с глицерином. ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости модифицированной смесью Фолча. Антиадгезивную активность и степень деструкции биопленок определяли спектрофотометрическим методом, антимикробную активность – по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Активность ферментов биосинтеза ПАВ анализировали в бесклеточных экстрактах, полученных после разрушения клеток ультразвуком. **Результаты.** Дополнительное внесение 0,5–1,0 г/л хлорида натрия, хлорида калия или их смеси в среду культивирования штамма ИМВ В-7405 сопровождалось синтезом ПАВ, минимальные ингибирующие концентрации которых по отношению к бактериальным и дрожжевым тест-культурам были соответственно в 2–125 и 2–30 раз ниже, адгезия бактерий на абиотических материалах, обработанных такими ПАВ, в 1,1–1,6 раза ниже, а степень разрушения дрожжевых биопленок на 25–48% выше по сравнению с показателями, установленными для ПАВ, полученных на базовой среде. Антимикробная и антиадгезивная активность ПАВ коррелировала с НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназной активностью (ключевой фермент биосинтеза аминокислот – наиболее эффективных антимикробных агентов среди поверхностно-активных веществ). Повышение в 1,2 раза (до 5,6 г/л) концентрации ПАВ при выращивании штамма ИМВ В-7405 в среде с 1,0 г/л хлорида натрия обусловлено усилением синтеза гликолипидов, о чем свидетельствовало увеличение в 1,6 раза ФЕП-синтетазной активности (ключевой фермент глюконеогенеза) по сравнению с показателями на базовой среде. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о возможности повышения антимикробной и антиадгезивной активности микробных ПАВ изменением в среде культивирования продуцента содержания катионов – потенциальных активаторов ключевых ферментов биосинтеза составляющих комплекса ПАВ, ответственных за эти биологические свойства.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, поверхностно-активные вещества, катионы калия и натрия, антимикробные и антиадгезивные свойства, биосинтез.

INFLUENCE OF MONOVALENT CATIONS ON SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 SURFACTANTS

T.P. Pirog^{1,2}, L.V. Kliuchka¹, T.A. Shevchuk², G.O. Iutynska²

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

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

Summary

Aim. Study of the synthesis and biological properties of surfactants synthesized by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 in a medium with different content of potassium and sodium cations. **Methods.** Strain IMV B-7405 was grown in medium with glycerol. The surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid by modified Folch mixture. Anti-adhesive activity and the degree of biofilms destruction were determined by the spectrophotometric method, antimicrobial activity – by index of the minimum inhibitory concentration. (MIC). The activity of enzymes responsible for surfactants' biosynthesis was analyzed in cell-free extracts obtained after ultrasonic destruction of cells. **Results.** Addition of sodium chloride (0.5–1.0 g/l), potassium chloride or their mixture into the medium cultivation of the IMV B-7405 strain was accompanied by the synthesis of surfactants, the minimum inhibitory concentrations of which against bacteria and yeast

were, respectively, in 2–125 and 2–30 times lower, the adhesion on abiotic surfaces treated with such surfactants was 1.1–1.6 times lower, and the degree of yeast biofilms destruction was 25–48% higher compared to the indicators established for surfactants obtained on the base medium. The antimicrobial and antiadhesive activity of surfactants correlated with NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase activity (a key enzyme of the aminolipids' biosynthesis, the most effective antimicrobial agents among surfactants). The increasing surfactants concentration in 1.2 times (up to 5.6 g/l) when strain IMV B-7405 was grown in the medium with 1.0 g/l of sodium chloride was associated with an increase in the synthesis of glycolipids, as evidenced by an increase of 1,6 times of phosphoenolpyruvate(PEP)-synthetase activity (a key enzyme of gluconeogenesis) compared with indicators on the base medium. **Conclusions.** The obtained data indicate the possibility of increasing the antimicrobial and anti-adhesive activity of microbial surfactants by changing in the cultivation medium the content of cations – potential activators of the key enzymes of biosynthesis components surfactants responsible for these biological properties.

Keywords: *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, potassium and sodium cations, antimicrobial and anti-adhesive properties, biosynthesis.

1. Nurfarahin AH, Mohamed MS, Phang LY. Culture medium development for microbial-derived surfactants production-an overview. *Molecules*. 2018; 23(5). doi: 10.3390/molecules23051049.
2. Henkel M, Geissler M, Weggenmann F, Hausmann R. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnol J*. 2017; 12(7). doi: 10.1002/biot.201600561.
3. Nitschke M, Silva SSE. Crit Recent food applications of microbial surfactants. *Rev Food Sci Nutr*. 2018; 58(4):631–38. doi: 10.1080/10408398.2016.1208635.
4. Pinazo A, Manresa MA, Marques AM, Bustelo M, Espuny MJ, Pérez L. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv Colloid Interface Sci*. 2016;228:17–39. doi: 10.1016/j.cis.2015.11.007.
5. Pirog TP, Nikituk LV, Tymoshuk KV, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on fried sunflower oil]. *Mikrobiol Z*. 2016; 78(2):2–12. Ukrainian.
6. Pirog TP, Nikituk LV, Iutynska GO. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on byproduct of biodiesel production]. *Mikrobiol Z*. 2016; 78(5):12–20. Ukrainian.
7. Pirog TP, Nikituk LV, Antonuk SI, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Peculiarities of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesis on waste oil of different quality and their antimicrobial properties]. *Mikrobiol Z*. 2017; 79(2):13–22. Ukrainian.
8. Aleksic I, Petkovic M, Jovanovic M, Milivojevic D, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J, et al. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front. Microbiol*. 2017; 8:2454. doi: 10.3389/fmicb.2017.02454.
9. Wittgens A, Santiago-Schuebel B, Henkel M., Tiso T, Blank L., Hausmann R, Hofmann D, Wilhelm S, Jaeger KE, Rosenau F. Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida* – a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2017. doi: 10.1007/s00253-017-8702-x.

10. Tiso T, Zauter R, Tulke H, Leuchtle B, Li WJ, Behrens B, et al. Designer rhamnolipids by reduction of congener diversity: production and characterization. *Microb. Cell. Fact.* 2017; 16(1). doi: 10.1186/s12934-017-0838-y.
11. Pirog TP, Sidor IV, Lutsai DA. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants. *Biotechnologia Acta.* 2016; 9(6):50–57. [https://doi.org/ 10.15407/biotech9.06.050](https://doi.org/10.15407/biotech9.06.050).
12. Pirog TP, Nikituk LV, Shevchuk TA. [Influence of divalent cations on synthesis of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants with high antimicrobial and anti-adhesion activity]. *Mikrobiol Zh.* 2017; 79(5):13–22. Ukrainian.
13. Pirog T P, Shevchuk TA, Voloshina IN, Gregirchak NN. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2005; 41(1):51–55.
14. Bligh EG , Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37(8):911–17.
15. Gomes M-ZV, Nitschke M. Evaluation of rhamnolipids surfactants as agents to reduce the adhesion of *Staphylococcus aureus* to polystyrene surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 49(1):960–65.
16. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(3):248–54.
17. Pirog TP, Shevchuk TA, Petrenko NM, Paliichuk OI, Iutynska GO. [Influence of Cultivation Conditions of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 on the Properties of Synthesized Surfactants]. *Mikrobiol. Z.* 2018; 80(4):13–27. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj80.04.013>.
18. Pirog TP, Shevchuk TA, Klimenko IuA. [Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane]. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2010; 46(6):651–58.
19. Pacheco GJ, Ciapina EM, Gomes Ede B, Junior NP. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(3):685–93. doi: 10.1590/S1517-83822010000300019.
20. Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination.* 2012; 285:198–4. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.10.002>.
21. Prima SI, Basyiruddin MI, Hertadi R. Bioconversion of palm oil into biosurfactant by *Halomonas meridiana* BK-AB4 for the application of corrosion inhibitor. *Indones. J. Chem.* 2018; 18(4):718–23. doi: 10.22146/ijc.27040.
22. Kim HS, Yoon BD, Lee CH, Suh HH, Oh HM, Katsuragi T, et al. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment Bioeng.* 1997; 84(1):41–6.
23. Gu D, Jiao Y, Wu J, Liu Z, Chen Q. Optimization of EPS Production and Characterization by a halophilic bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology. *Molecules.* 2017; 22(5). doi: 10.3390/molecules22050814.
24. Chen G, Wang J, Su Y, Zhu Y, Zhang G, Zhao H, et al. Pullulan production from synthetic medium by a new mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* 2017; 47(10):963–69. doi:10.1080/10826068.2017.1350979.

25. Rodrigues AI, Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Sci Rep.* 2017; 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-13424-x.
26. Kaunietis A, Pranckutė R, Lastauskienė E, Čitavičius DJ. Medium Optimization for Bacteriocin Production and Bacterial Cell Growth of *Geobacillus* sp. 15 Strain. *J Antimicrob Agents.* 2017; 3(1). doi:10.4172/2472-1212.1000133.
27. Pirog TP, Lutsay DA, Kliuchka LV, Beregova KA. Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta.* 2019; 12(1):39–58.
28. Chebbi A, Elshikh M, Haque, Ahmed S, Dobbin S, Marchant R et al. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *J. Basic Microbiol.* 2017; 57(5):364–75. doi: 10.1002/jobm.201600658.
29. Aleksic I, Petkovic M, Jovanovic M, Milivojevic D, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J et al. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front. Microbiol.* 2017; 8:2454. doi: 10.3389/fmicb.2017.02454.
30. Masák J, Čejková A, Schreiberová O, Režanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 89(1):1–14. doi: 10.1111/1574-6941.12344.

Отримано 20.03.2019