

ДЕСТРУКЦІЯ БІОПЛІВОК ЗА ДІЇ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН, СИНТЕЗОВАНИХ У РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405

Т.П. Пирог^{1,2}, І.В. Ключка¹, 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

Утворення біоплівок на різних поверхнях є небезпечним явищем, оскільки мікроорганізми в їх складі характеризуються підвищеною резистентністю до різних біоцидів. Тому актуальним є пошук нових ефективних, здатних до руйнування біоплівок сполук, у тому числі й мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР). **Мета.** Дослідити вплив умов культивування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на здатність синтезованих ПАР руйнувати біоплівки. **Методи.** Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали в середовищі з очищеним гліцерином, рафінованою і відпрацьованою соняшниковою олією різної якості, відходах виробництва біодизелю та суміші субстратів до ранньої і пізньої стаціонарної фази росту. ПАР екстрагували з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1). Ступінь руйнування біоплівки визначали спектрофотометричним методом. **Результати.** Встановлено, що ступінь деструкції бактеріальних та дріжджової біоплівок за наявності ПАР залежав від умов культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (природа, концентрація, якість ростового субстрату та тривалість процесу). Найвищий ступінь руйнування бактеріальних біоплівок (53–78%) спостерігався за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих на суміші відходів виробництва біодизелю та м'яси. Деструкція біоплівки *Candida albicans* Д-6 була максимальною (52–72%) за наявності ПАР, одержаних на очищеному гліцерині. Збільшення тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на рафінованій та відпрацьованій після смаження «картоплі селянської» олії супроводжувалося синтезом ПАР, за дії яких ступінь руйнування біоплівок бактеріальних тест-культур знижувався у 1,3–2,2 рази. Вища деструкція біоплівок за дії супернатантів порівняно з використанням розчинів поверхнево-активних речовин аналогічної концентрації може бути зумовлена синтезом *N. vaccinii* ІМВ В-7405 інших, відмінних від ПАР, метаболітів, здатних до руйнування біоплівок. **Висновки.** Наведені дані свідчать про те, що ПАР, синтезовані в різних умовах культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405, здатні руйнувати бактеріальні та дріжджові біоплівки. Залежність ступеня деструкції біоплівок за наявності ПАР від умов вирощування продуцента потрібно враховувати при розробці технологій одержання цих продуктів мікробного синтезу.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, поверхнево-активні речовини, руйнування біоплівок, природа джерела вуглецю, тривалість культивування.

Утворення та поширення біоплівок є однією з основних проблем медицини у XXI столітті [1, 2]. Так, колонізація поверхонь медичних матеріалів

(катетерів, штучних серцевих клапанів, силіконових імплантів) є причиною поширення внутрішньолікарняних інфекцій у більш, ніж 50% пацієнтів, спричинених штамами *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* [3]. Окрім цього, за даними останніх досліджень саме утворення біоплівки є причиною поширення генів стійкості до антибіотиків [4]. Такі дані вказують на необхідність пошуку нових, альтернативних антибіотикам, антимікробних сполук, одними з яких є мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР).

У нещодавно опублікованому огляді літератури [5] ми зазначали, що перші згадки про використання мікробних ПАР для деструкції біоплівки з'явилися лише на початку 90-х років ХХ ст., проте з кожним роком кількість таких досліджень невпинно зростає [6–10]. Це зумовлено насамперед високою ефективністю поверхнево-активних речовин мікробного походження та можливістю їх одержання на промислових відходах [11, 12].

Раніше [13–15] нами встановлена можливість синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на широкому наборі моно- і змішаних субстратів, як традиційних (очищений гліцерин), так і промислових відходах (пересмажена соняшникова олія, відходи виробництва біодизелю, м'яса). Пізніше [16, 17] було показано, що ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 притаманна антимікробна та антиадгезивна активність, яка залежить від умов вирощування продуцента.

Оскільки і антимікробна дія поверхнево-активних речовин, і їх здатність знижувати адгезію мікроорганізмів на різних поверхнях [5] лежить в основі механізму деструкції біоплівки за наявності цих продуктів мікробного синтезу, мета даної роботи – дослідити вплив умов культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на здатність синтезованих поверхнево-активних речовин руйнувати біоплівки.

Матеріали і методи. Основним об'єктом досліджень був виділений нами із забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* 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 ступеня руйнування біоплівки використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccinii ІМВ В-7405 вирощували у рідкому середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, дріжджовий автолізат 0,5% (об'ємна частка). Як джерело вуглецю використовували: свіжу рафіновану олію «Олейна» (Дніпропетровський олійно-екстракційний завод), а також відпрацьовану після смаження картоплі «фрі», «картоплі селянської» та м'яса соняшникову олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 2 % (об'ємна частка); очищений гліцерин (2 і 5%, об'ємна частка) та відходи виробництва біодизелю (технічний гліцерин, Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.) у концентрації 3,3 і 8,0 %

(об'ємна частка); суміш відходів виробництва біодизелю (7 %, об'ємна частка) та меляси (1%, масова частка за вуглеводами). Під час вирощування продуцента на відходах виробництва біодизелю (8 %) концентрацію NaNO_3 у середовищі підвищували до 1,0 г/л.

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену у середовищі наведеного вище складу з 0,5% відповідного субстрату. При культивуванні штаму на суміші субстратів як інокулят використовували культуру, вирощену на змішаному субстраті, що містив по 0,25% кожного з моносубстратів. Інокулят, 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 120–168 год.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини у вигляді супернатанту культуральної рідини і розчину ПАР, екстрагованих з супернатанту модифікованим нами методом Блайя і Дайера [18], як описано у наших роботах [13–17]. Для одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв.

Дослідження впливу ПАР на руйнування біоплівки здійснювали наступним чином. Для формування біоплівки у полістиролові мікропланшети вносили 180 мкл МПБ чи рідкого сусла та 20 мкл суспензії одnodобової тест-культури, інкубували упродовж 24 год при оптимальній для тест-культури температурі, 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 (розчину поверхнево-активних речовин або супернатанту) 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.

Усі досліди проводили в 3-х повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у попередніх роботах [13–17]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значущості $p < 0,05$.

Результати. У табл. 1 наведено дані щодо деструкції бактеріальних та дріжджової біоплівок за дії ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, синтезованих на олієвмісних субстратах.

Поверхнево-активні речовини, одержані на усіх субстратах, проявляли здатність до руйнування біоплівки, проте ступінь деструкції залежав від тривалості культивування, типу тест-культури та якості олії у середовищі. Так, збільшення тривалості культивування штаму IMB B-7405 на рафінованій та відпрацьованій олії після смаження «картоплі селянської» супроводжувалося синтезом ПАР, за дії яких ступінь руйнування біоплівки бактеріальних тест-культур знижувався у 1,3–2,2 рази порівняно з

використанням поверхнево-активних речовин, утворених у більш ранній фазі росту. У той же час деструкція бактеріальних біоплівки, оброблених розчинами ПАР, синтезованими як у ранній, так і у пізній стаціонарній фазі росту штаму ІМВ В-7405 на олії після смаження м'яса та картоплі «фрі» була практично однаковою. Деякі інші закономірності спостерігалися у разі використання поверхнево-активних речовин для руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6. Так, зі збільшенням тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на усіх олієвмісних субстратах утворювалися ПАР, за наявності яких ступінь руйнування дріжджової біоплівки був у 1,3–2,0 рази вищим, ніж після обробки поверхнево-активними речовинами, синтезованими у ранній стаціонарній фазі росту.

Таблиця 1

Руйнування біоплівки ПАР, синтезованими *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на рафінованій та відпрацьованій соняшниковій олії

Олія як субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	Руйнування біоплівки (%) після обробки ПАР (40 мкг/мл), синтезованими у стаціонарній фазі росту	
		ранній	пізній
Рафінована	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	66	48
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	35	20
	<i>Candida albicans</i> Д-6	28	44
Після смаження «картоплі селянської»	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	71	32
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	56	35
	<i>Candida albicans</i> Д-6	26	35
Після смаження картоплі «фрі»	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	40	45
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	39	40
	<i>Candida albicans</i> Д-6	21	41
Після смаження м'яса	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	46	40
	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	47	45
	<i>Candida albicans</i> Д-6	25	39

Примітка: Табл. 1–4: під час визначення ступеня руйнування біоплівки похибка не перевищувала 5 %.

У табл. 2 наведено результати щодо руйнування біоплівки тест-культур за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих на суміші субстратів. Встановлено, що незалежно від тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на змішаному субстраті синтезувалися поверхнево-активні речовини, після обробки якими спостерігали досить високий ступінь руйнування бактеріальних біоплівок (53–75%), причому така закономірність спостерігалася для досить низьких концентрацій ПАР (8–32 мкг/мл). Як і за умов росту на олієвмісних субстратах, при культивуванні штаму ІМВ В-7405 на суміші відходів виробництва біодизелю та м'яса у пізній стаціонарній фазі синтезувалися ПАР, які ефективніше руйнували біоплівку *C. albicans* Д-6 порівняно з поверхнево-активними речовинами, утвореними у більш ранній ростовій фазі.

У табл. 3 представлені дані щодо деструкції біоплівок за дії поверхнево-активних речовин, синтезованих на гліцерині різного ступеня очищення. Ці дані свідчать про те, що ступінь руйнування біоплівки за дії ПАР,

синтезованих на відходах виробництва біодизелю, є дещо нижчим, ніж за наявності поверхнево-активних речовин, одержаних на очищеному гліцерині. Зазначимо, що ступінь деструкції біоплівки *C. albicans* Д-6 після обробки ПАР, синтезованими на гліцерині різного ступеня очищення, був вищим (40–72%), ніж за дії ПАР, отриманих на олієвмісних субстратах (39–44%) (табл. 1). Зі збільшенням у середовищі культивування штаму ІМВ В-7405 концентрації обох субстратів синтезувалися ПАР, які менш ефективно руйнували як бактеріальні, так і дріжджову біоплівку.

На наступному етапі досліджували ступінь деструкції біоплівок препаратами ПАР різного ступеня очищення (рис. 1 і 2, табл. 4).

Таблиця 2

Деструкція біоплівок за дії розчинів ПАР, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші відходів виробництва біодизелю та меляси

Стаціонарна фаза росту	Концентрація ПАР, мкг/мл	Руйнування біоплівки, %		
		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Pseudomonas</i> sp. М-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
Рання	32	74	67	35
	16	67	63	36
	8	55	60	45
Пізня	32	74	71	49
	16	63	75	51
	8	53	78	61

Таблиця 3

Вплив ПАР *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю, на біоплівку

Гліцерин	Концентрація гліцерину, %	Деструкція біоплівки, %		
		<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
Очищений	2,0*	26	66	72
	5,0**	18	40	52
Відходи виробництва біодизелю	3,3*	15	37	56
	8,0**	16	33	40

Примітки: Як препарати використовували розчини ПАР (25 мкг/мл). Культивування здійснювали до ранньої стаціонарної фази росту.

* – концентрації очищеного гліцерину (2,0 %) та відходів виробництва біодизелю (3,3 %) еквімолярні за вуглецем.

** – концентрації очищеного гліцерину (5,0 %) та відходів виробництва біодизелю (8,0 %) еквімолярні за вуглецем.

Експерименти показали, що супернатант культуральної рідини після вирощування штаму ІМВ В-7405 на суміші субстратів виявився більш ефективним деструктором бактеріальних біоплівок, ніж розчин екстрагованих з нього поверхнево-активних речовин аналогічної концентрації (рис. 1). У той же час деструкція дріжджової біоплівки була практично однаковою і становила 52–54% як за дії розчину ПАР, так і супернатанту.

Інші закономірності спостерігалися у разі використання для деструкції біоплівки поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю. Так, ступінь руйнування біоплівки *C. albicans* Д-6 за наявності супернатанту був вищим, ніж за дії розчину ПАР аналогічної концентрації, а деструкція біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 становила 20–25% як за обробки розчином поверхнево-активних речовин, так і супернатанту (рис. 2).

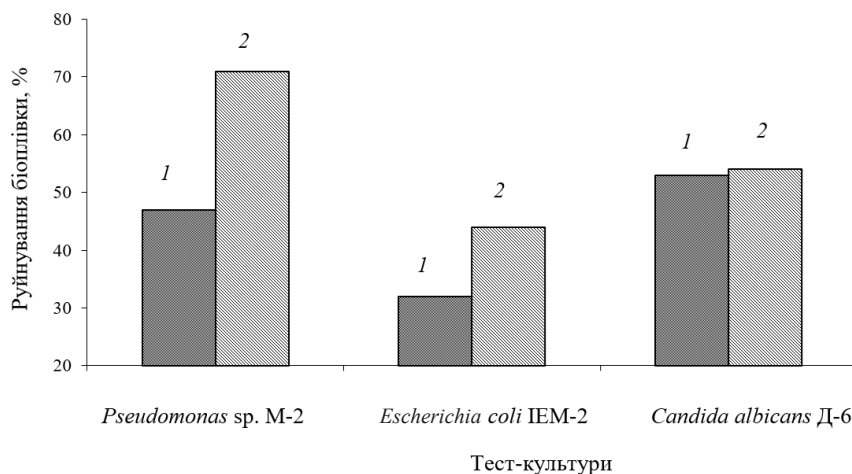


Рис. 1. Деструкція біоплівок за дії ПАР різного ступеня очищення, синтезованих на суміші відходів виробництва біодизелю та меляси

Препарати ПАР: 1 – розчин ПАР, 2 – супернатант. Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали до ранньої стаціонарної фази. Концентрація ПАР у препаратах 2 мкг/мл

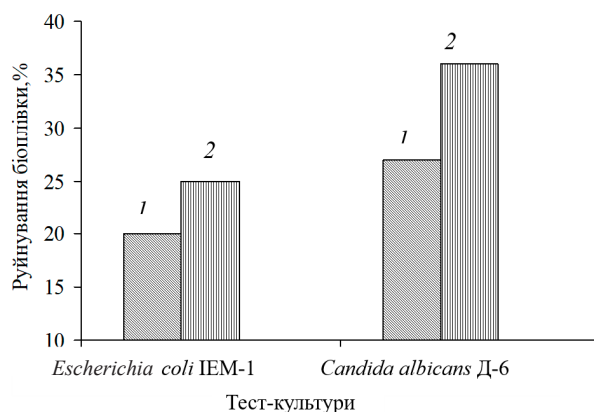


Рис. 2. Руйнування біоплівок за дії препаратів ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю (8,0 %)

Препарати ПАР: 1 – розчин ПАР, 2 – супернатант. Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали до ранньої стаціонарної фази. Концентрація ПАР у препаратах 2 мкг/мл

Дані, наведені у табл. 4, свідчать про те, що ступінь руйнування біоплівки *E. coli* ІЕМ-1 за наявності розчинів ПАР, синтезованих на усіх олієвмісних субстратах, був нижчим, ніж після обробки супернатантом з аналогічною концентрацією поверхнево-активних речовин, а ступінь

руйнування дріжджової біоплівки не залежав від ступеня очищення препаратів ПАР.

Таблиця 4

Здатність препаратів ПАР різного ступеня очищення, синтезованих *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на олієвмісних субстратах, руйнувати біоплівки

Олія для синтезу ПАР	Препарати	Тест-культура	Руйнування біоплівки (%) після обробки препаратами ПАР, мкг/мл			
			160	80	40	20
Рафінована	Розчин ПАР	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	20	24	29	31
		<i>Candida albicans</i> Д-6	38	37	38	Н.в.
	Супернатант	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	45	48	49	40
		<i>Candida albicans</i> Д-6	41	39	39	48
Після смаження картоплі «фрі»	Розчин ПАР	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	39	40	29	27
		<i>Candida albicans</i> Д-6	37	33	27	15
	Супернатант	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	53	50	47	40
		<i>Candida albicans</i> Д-6	37	37	28	14
Після смаження м'яса	ПАР	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	38	45	47	47
		<i>Candida albicans</i> Д-6	37	37	35	28
	Супернатант	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1	52	55	57	55
		<i>Candida albicans</i> Д-6	35	36	32	26

Примітки: Н.в. – не визначали. Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснювали до ранньої стаціонарної фази.

Обговорення. В основі руйнування біоплівок за наявності мікробних ПАР лежить ряд механізмів: по-перше, їм притаманна здатність знижувати поверхневий і міжфазний натяг біоплівок; по-друге, завдяки антимікробній дії, яка полягає у порушенні цілісності цитоплазматичної мембрани, збільшується її проникність, що призводить до втрати клітиною життєздатності, по-третє, завдяки антиадгезивній дії, зумовленої зміною поверхневого заряду клітин і поверхні, зменшується кількість прикріплених до поверхні мікроорганізмів [19, 20].

Вибір умов культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 для дослідження здатності синтезованих ПАР руйнувати біоплівки був зумовлений такими причинами: по-перше, концентрація поверхнево-активних речовин, синтезованих на відходах виробництва біодизелю та суміші субстратів була максимальною і становила 5,3–7,5 г/л [14, 15]; по-друге, у попередніх роботах була досліджена антимікробна та антиадгезивна активність препаратів ПАР, синтезованих на рафінованій та пересмаженій олії різної якості, а також на відходах виробництва біодизелю [16, 17]; по-третє, антимікробна активність поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 залежала від якості пересмаженої олії (значення мінімальних інгібуючих концентрацій ПАР, синтезованих на олії після смаження м'яса, були в 1,5–2,5 рази нижчими, ніж поверхнево-активних речовин, одержаних на олії після смаження картоплі) [16].

Крім того, на сьогоднішній день у доступній літературі відсутня інформація про деструкцію біоплівок за дії ПАР, синтезованих на промислових відходах, хоча наявна велика кількість робіт про здатність мікробних

поверхнево-активних рамноліпідів і ліпопептидів руйнувати біоплівки [6, 8, 10, 21–23]. Зазначимо, що у більшості цих робіт як тест-культури дослідники використовували штами *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus mutans* [21–23].

Порівняння поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і відомих мікробних ПАР як деструкторів біоплівок проведемо, аналізуючи публікації, в яких як тест-культури були використані штами *E. coli*, *B. subtilis* та *C. albicans* [24–27]. Так, у роботі [24] встановлено, що монорамноліпід, синтезований *P. aeruginosa* АТСС 9027 на глюкозі, у достатньо високій концентрації (0,4 мг/мл) практично повністю руйнували біоплівку *B. subtilis* ВВК006. Аналогічний ступінь руйнування біоплівки штаму ВВК006 спостерігали і за використання дирамноліпідів (0,4 мг/мл), утворених *Burkholderia thailandensis* E264 на очищеному гліцерині [24]. У статті [25] повідомляється, що за дії 5 мг/мл дирамноліпідів, синтезованих *P. aeruginosa* DSVР20 на гліцерині, деструкція біоплівки *C. albicans* МТСС 227 досягала 90%. Ліпопептиди штаму *B. subtilis* НТ73 у концентрації 0,1 мг/мл руйнували на 90% біоплівку *E. coli* ТН5 [26], а за дії ліпопептидів *B. subtilis* АR2 (щоправда, у вищій концентрації, яка становила 1–6 мг/мл) спостерігали деструкцію на 80 % біоплівки різних штамів *C. albicans* (МТСС 1637, МТСС 4748, МТСС 183) [27]. Результати наших досліджень, наведені у даній роботі, свідчать про те, що поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезовані на широкому наборі вуглецевих субстратів, здатні ефективно руйнувати біоплівки у концентраціях, значно нижчих (2–60 мкг/мл), ніж описані у літературі рамно- та ліпопептиди.

Зазначимо, що на теперішній час у літературі відсутня інформація про вплив умов культивування продуцентів на здатність синтезованих ПАР руйнувати біоплівки. Нами показано, що ступінь руйнування біоплівок за наявності ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежав від концентрації, природи та якості джерела вуглецю у середовищі вирощування штаму ІМВ В-7405 і тривалості його культивування. Таку саму залежність було встановлено нами раніше під час дослідження антимікробної та антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин, синтезованих *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на пересмаженій соняшниковій олії та відходах виробництва біодизелю [16, 17]. Однією з причин цього може бути те, що мікробні ПАР є вторинними метаболітами, які синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, склад і співвідношення яких може змінюватися залежно від умов культивування продуцента, що, в свою чергу, спричиняє зміну властивостей цільового продукту.

Крім того, у роботах [6, 8, 10, 21–27] для деструкції біоплівок використовували лише розчини очищених мікробних ПАР. У доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про порівняння супернатантів і виділених з них поверхнево-активних речовин як деструкторів біоплівок. Зазначимо, що й відомості про використання супернатантів, що містять поверхнево-активні речовини, для руйнування біоплівок є вкрай обмеженими. Так, Ciandrini з колегами [28] досліджували руйнування біоплівок ротових патогенів *Streptococcus mutans* АТСС 25175 і *Streptococcus oralis* АТСС 9811 за наявності діалізованих ПАР-вмісних супернатантів культуральної рідини після вирощування різних штамів лактобактерій.

Встановлено, що супернатанти з достатньо високою концентрацією ПАР (1–10 мг/мл) забезпечували руйнування біоплівки досліджуваних тест-культур на 74–98%.

Наші дослідження (рис. 1 і 2, табл. 4) показали можливість використання для деструкції біоплівки супернатантів культуральної рідини після вирощування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на різних промислових відходах, що суттєво підвищує ефективність технологій одержання поверхнево-активних речовин, оскільки дає змогу виключити з технологічного процесу недешеву стадію екстракції ПАР.

Результати, наведені на рис. 1 і 2, а також у табл. 4, виявилися дещо неочікуваними, оскільки в деяких варіантах супернатант ефективніше руйнував біоплівку тест-культур, ніж виділені з нього розчини ПАР аналогічної концентрації. Раніше подібні результати були одержані нами під час дослідження дії ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на фітопатогенні бактерії [29]. Крім того, нами було встановлено, що у деяких випадках не тільки супернатант, а й водна фаза, що залишалася після екстракції ПАР з супернатанту, характеризувалася вищою антимікробною активністю, ніж розчин поверхнево-активних речовин [29]. Ми висловили припущення, що це явище може бути зумовлене тим, що *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує інші, відмінні від ПАР, метаболіти з високою антимікробною активністю. У попередній статті [29] ми навели відомі на той час дані щодо синтезу представниками роду *Nocardia* ряду антибіотиків. Зазначимо, що й останніми роками у літературі також з'являється інформація про утворення антимікробних сполук бактеріями роду *Nocardia* [30, 31].

Дані, наведені на рис. 1 і 2, табл. 4, дають змогу припустити, що залежно від природи джерела вуглецю у середовищі *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує, крім поверхнево-активних речовин, ще й метаболіти з антибактеріальними або антифунгальними властивостями.

Отже, наведені у цій статті дані засвідчують, що ПАР, синтезовані в різних умовах культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405, здатні руйнувати бактеріальні та дріжджові біоплівки. Залежність ступеня деструкції біоплівки за наявності ПАР від умов вирощування продуцента потрібно враховувати при розробці технологій одержання цих продуктів мікробного синтезу.

ДЕСТРУКЦИЯ БИОПЛЕНК В ПРИСУТСТВИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *NOCARDIA VACCINII* ИМВ В-7405

Т.П. Пирог^{1,2}, И.В. Ключка¹, 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

Образование биопленок на различных поверхностях является опасным явлением, поскольку микроорганизмы в их составе характеризуются повышенной резистентностью к различным биоцидам. Поэтому актуальным является поиск

новых эффективных, способных к разрушению биопленок соединений, в том числе и микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ). **Цель.** Исследовать влияние условий культивирования *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на способность синтезированных поверхностно-активных веществ (ПАВ) разрушать биопленки. **Методы.** Культивирование штамма ИМВ В-7405 осуществляли в среде с очищенным глицерином, рафинированным и отработанным подсолнечным маслом различного качества, отходах производства биодизеля и смеси субстратов до ранней и поздней стационарной фазы роста. ПАВ экстрагировали из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1). Степень разрушения биопленки определяли спектрофотометрическим методом. **Результаты.** Установлено, что степень деструкции бактериальных и дрожжевой биопленок в присутствии ПАВ зависела от условий культивирования *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (природа, концентрация, качество ростового субстрата и длительность процесса). Наиболее высокая степень разрушения бактериальных биопленок (53–78%) наблюдалась при действии поверхностно-активных веществ, синтезированных на смеси отходов производства биодизеля и мелассы. Деструкция биопленки *Candida albicans* Д-6 была максимальной (52–72%) в присутствии ПАВ, полученных на очищенном глицерине. Увеличение длительности культивирования *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на рафинированном и отработанном после жарки «картофеля селянского» масле сопровождалось синтезом ПАВ, при действии которых степень разрушения биопленок бактериальных тест-культур снижалась в 1,3–2,2 раза. Более высокая деструкция биопленок в присутствии супернатантов по сравнению с использованием растворов поверхностно-активных веществ аналогичной концентрации может быть обусловлена синтезом *N. vaccinii* ИМВ В-7405 других, отличных от ПАВ, метаболитов, способных к разрушению биопленок. **Выводы.** Приведенные данные свидетельствуют о том, что ПАВ, синтезированные в различных условиях культивирования *N. vaccinii* ИМВ В-7405, способны разрушать бактериальные и дрожжевые биопленки. Зависимость степени деструкции биопленок при наличии ПАВ от условий выращивания продуцента необходимо учитывать при разработке технологий получения этих продуктов микробного синтеза.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, поверхностно-активные вещества, разрушение биопленок, природа источника углерода, длительность культивирования.

BIOFILM DESTRUCTION IN THE PRESENCE OF SURFACTANTS SYNTHESIZED UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS OF *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

T.P. Pirog^{1,2}, I.V.Kliuchka¹, L.V.Kliuchka¹, T.A. Shevchuk², G.O. Iutyńska²

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

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

Summary

The formation of biofilms on various surfaces is a dangerous phenomenon, since microorganisms in their composition are characterized by increased resistance to different

biocides. Therefore, the search for new effective compounds capable of destroying biofilms, including microbial surfactants, is actual. **Aim.** To study the effect of the cultivation conditions of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on the ability of the synthesized surfactants to destroy biofilms. **Methods.** The IMV B-7405 strain was grown in a medium with purified glycerol, refined and fried sunflower oil of various qualities, waste of biodiesel production and a mixture of substrates until the early and late stationary growth phase. The surfactants were extracted from supernatant of cultural liquid with a mixture of chloroform and methanol (2:1). The degree of biofilm destruction was determined by spectrophotometric method. **Results.** It was established that the degree of bacterial and yeast biofilms destruction in the presence of surfactants depended on the cultivation conditions of *N. vaccinii* IMV B-7405 (nature, concentration, quality of the growth substrate and the duration of the process). The highest degree of bacterial biofilms destruction (53–78%) was observed under the action of surfactants synthesized on a mixture of waste of biodiesel production and molasses. The destruction of *Candida albicans* D-6 biofilm was maximal (52–72%) in the presence of surfactants obtained on purified glycerol. Increasing the duration of *N. vaccinii* IMV B-7405 cultivation on refined and after frying «potato selyanski» oil was accompanied by the synthesis of surfactants, under the action of which the degree of destruction of bacterial test cultures biofilms decreased 1.3–2.2 times. Higher destruction of biofilms in the presence of supernatants compared to using surfactants solutions of similar concentration may be due to the synthesis of *N. vaccinii* IMV B-7405 other, non-surfactant, metabolites capable of destroying biofilms. **Conclusions.** The presented data indicate that surfactants synthesized under different cultivation conditions of *N. vaccinii* IMV B-7405 are capable to destroy bacterial and yeast biofilms. The dependence of the biofilms degree destruction in the presence of surfactants on the producer growing conditions must be considered when technologies of production of these microbial synthesis products are being developed.

Key words: *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, destruction of biofilms, nature of carbon source, duration of cultivation.

1. Kamaruzzaman F, Tan P, Mat Yazid A, Saeed I, Hamdan H, Choong S et al. Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. *Materials (Basel)*. 2018; 11(9):552–4. doi: 10.3390/ma11091705
2. Johani K, Abualsaud D, Costa DM, Hu H, Whiteley G, Deva A et al. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *J Infect Public Health*. 2018;11(3):418–24. doi: 10.1016/j.jiph.2017.10.005
3. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018; 9(1):522–54. doi: 10.1080/21505594.2017.1313372
4. Hathroubi S, Mekni A, Domenico P, Nguyen D, Jacques M. Biofilms: microbial shelters against antibiotics. *Microbial Drug Resistance*. 2017; 23(2):147–56. doi:10.1089/mdr.2016.0087
5. Pirog TP, Savenko IV, Lutsay DA. Microbial surface-active substances as antiadhesive agents. *Biotechnologia Acta*. 2016; 9(3):7–22. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.007>
6. Dalilia D, Aminib M, Faramarzi MA, Fazelia R, Khoshayanda MR, Samadi N. Isolation and structural characterization of Coryxin, a novel cyclic lipopeptide from

- Corynebacterium xerosis* NS5 having emulsifying and anti-biofilm activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2015; 135:425–32. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.005
7. Sharma D, Saharan S, Chauhan N, Procha S, Lal S. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springerplus*. 2015; 4:4. doi: 10.1186/2193-1801-4-4
 8. Ceresa C, Rinaldi M, Chiono V, Carmagnola I, Allegrone G, Fracchia L. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* AC7 inhibit adhesion and biofilm formation of *Candida albicans* on silicone. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2016;109(10):1375–88. doi: 10.1007/s10482-016-0736-z
 9. Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H et al. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microb Pathog*. 2019;127:12–20. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.039
 10. Jovanovic M, Radivojevic J, O'Connor K, Blagojevic S, Begovic B, Lukic V et al. Rhamnolipid inspired lipopeptides effective in preventing adhesion and biofilm formation of *Candida albicans*. *Bioorg Chem*. 2019; 87:209–17. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.03.023
 11. Mouafo H, Mbawala A, Ndjouenkeu R. Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *Biomed Res Int*. 2018; 2018:5034783. doi: 10.1155/2018/5034783
 12. Konishi M, Morita T, Fukuoka T, Imura T, Uemura S, Iwabuchi H et al. Efficient production of acid-form sphorolipids from waste glycerol and fatty acid methylesters by *Candida floricola*. *J Oleo Sci*. 2018; 67(4):489–96. doi: 10.5650/jos.ess17219
 13. Pidhorskyy V, Iutynska G, Pirog T. [Intensification of microbial synthesis technologies]. K.: Nauk. Dumka, 2010. 327 p. Ukrainian.
 14. Pirog TP, Sofilkanych AP, Shulyakova M, Shevchuk TA. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. *Food Bioprod Process*. 2015; 93:11–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>
 15. Pirog TP, Kudrya NB, Shevchuk TA, Beregova KA, Iutynska GO. [Bioconversion of crude glycerole and molasses mixture in biosurfactants of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405]. *Microbiol. Zh*. 2015; 77(3):28–35. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj77.03.028>. Russian.
 16. Pirog TP, Nikituk LV, Tymoshuk KV, Shevchuk TA, Iutynska GO. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on fried sunflower oil]. *Microbiol. Zh* 2016; 78(2):2–12. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.02.002>. Ukrainian.
 17. Pirog TP, Nikituk LV, Iutynska GO. [Biological properties of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants synthesized on by product of biodiesel production]. *Microbiol. Zh* 2016; 78(5):12–20. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj78.05.012>. Ukrainian.
 18. [Biochemical studies of membranes]. Ed. E. Meddy. M.: World. 1979. 300 p. Russian.
 19. Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q et al. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017; 101(15):5951–60. doi:10.1007/s00253-017-8396-0
 20. Mulligan N, Sharma K, Mudhoo A. *Biosurfactants: research trends and applications*. N.Y.: Taylor & Francis Group. 2014. 346 p.

21. 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
22. Diaz De Rienzo A, Stevenson S, Marchant R, Banat M. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(13):5773–9. doi: 10.1007/s00253-016-7310-5
23. Eckhard LH, Hourri-Haddad Y, Sol A, Zeharia R, Shai Y, Beyth S, et al. Sustained release of antibacterial lipopeptides from biodegradable polymers against oral pathogens. *PLoS One.* 2016; 11(9):e0162537. doi: 10.1371/journal.pone.0162537
24. De Rienzo A, Martin J. Effect of mono and di-rhamnolipids on biofilms pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr Microbiol.* 2016; 73(2):183–9. doi: 10.1007/s00284-016-1046-4
25. Singh N, Pemmaraju C, Pruthi A, Cameotra S, Pruthi V. *Candida* biofilm disrupting ability of di-rhamnolipid (RL-2) produced from *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 169(8):2374–91. doi: 10.1007/s12010-013-0149-7
26. Rivardo F, Turner J, Allegrone G, Ceri H, Martinotti G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 83(3):541–53.
27. Rautela R, Singh K, Shukla A, Cameotra S. Lipopeptides from *Bacillus* strain AR2 inhibits biofilm formation by *Candida albicans*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014; 105(5):809–21. doi: 10.1007/s10482-014-0135-2
28. Ciandrini E, Campana R, Casettari L, Perinelli DR, Fagioli L, Manti A et al. Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral streptococci biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(15): 6767–77. doi:10.1007/s00253-016-7531-7
29. Pirog TP, Konon AD, Sofilkanich AP, Iutynska GO. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Appl Biochem Microbiol.* 2013; 49(4):360–7. <https://doi.org/10.1134/S000368381304011X>
30. Dhakal D, Rayamajhi V, Mishra R, Sohng J.K. Bioactive molecules from *Nocardia*: diversity, bioactivities and biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2019; 46(3–4):385–407. doi: 10.1007/s10295-018-02120-y
31. Sakai K, Komaki H, Gono T. Identification and functional analysis of the Nocardithiocin gene cluster in *Nocardia pseudobrasiliensis*. *PLoS One* 2015; 10:e0143264. doi: 10.1371/journal.pone.0143264

Отримано 28.05.2019