

BIOLOGICAL PROPERTIES OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 AND *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 SYNTHESIZED ON INDUSTRIAL WASTE

L. Nikitiuk, I. Pavliukovets, I. Savenko
National University of Food Technologies

Key words:

Nocardia vaccinii IMB B-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, microbial surfactants, antyadhesive agents, antimicrobial properties, biofilm

Article history:

Received 09.09.2015
Received in revised form 29.09.2015
Accepted 2.10.2015

Corresponding author:

Inga_92@ukr.net

ABSTRACT

Antimicrobial and antyadhezyv properties of surface active substances (SAS) synthesized under *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 growth on friend sunflower oil and crude glycerol were studied .

It was established that adhesion of bacteria (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2) and yeast (*Candida albicans* D-6) surfactant preparations of *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,04 mg/ml) and *A.calcoaceticus* IMB B-7241 in the lower (0,005 mg/ml) concentrations was in average 15–86 %, and the minimal inhibitory concentration of *N. vaccinii* B-7405 and *A.calcoaceticus* IMB B-7241 SAS synthesized on industrial waste on the studied bacteria and yeast was within 8–68 µg/ml. These data shows the possibility to use *N. vaccinii* IMB-7404 and *A. calcoaceticus* IMB B-7241 surfactants as antiadhasive and antimicrobial preparation components

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 ТА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241, СИНТЕЗОВАНИХ НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ

Л.В. Никитюк, І.Ю. Павлюковець, студенти,[✉]
І.В. Савенко, аспірант
Національний університет харчових технологій

Досліджували антимікробні та антиадгезивні властивості поверхнево-активних (ПАР) речовин, синтезованих за умов росту *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 та *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій соняшниковій олії та технічному гліцерині. Встановлено, що після обробки абіотичних поверхонь (пластик, кахель, сталь, полівінілхлорид) препаратами ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,04 мг/мл) і *A.calcoaceticus* IMB B-7241 у нижчій (0,005 мг/мл) концентрації, адгезія бактерій (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2) та дріжджів (*Candida albicans* Д-6) становила у середньому 15–86 %, а мінімальна інгібуюча концентрація щодо досліджуваних бактерій і дріжджів ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 і *A.calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих на промислових відходах, перебувала у межах 8–68 мкг/мл.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, мікробні поверхнево-активні речовини, антиадгезивні агенти, біоплівка.

Вступ. Нині все більше дослідників розглядають поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження як альтернативну заміну синтетичним аналогам. Наявність стійких до відомих біоцидів мікробних спільнот зумовлює необхідність пошуку нових антимікробних та антиадгезивних препаратів якими можуть бути мікробні ПАР [1, 2].

Великомасштабне виробництво більшості мікробних поверхнево-активних сполук є економічно нерентабельним через низьку концентрацію кінцевого продукту і його високу собівартість. Одним з шляхів здешевлення таких технологій може бути використання як субстрату відпрацьованих (пересмажених) рослинних олій і технічного гліцерину — відходу виробництва біодизелю [4—6].

Раніше було встановлено, що ПАР синтезовані *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на очищеному гліцерині і *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на етанолі проявляли високі антимікробні та антиадгезивні властивості [7]. Зазначимо, що нещодавно у літературі з'явилися поодинокі повідомлення про залежність біологічних властивостей мікробних ПАР від природи джерела вуглецю у середовищі культивування продуцента [8].

Мета роботи — дослідити антиадгезивні та антимікробні властивості ПАР *N. vaccinii* IMB В-7405 та *A. calcoaceticus* IMB В-7241, синтезованих на відпрацьованій олії та технічному гліцерині.

Матеріали та методи. Об'єкти дослідження — штами *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *N. vaccinii* IMB В-7405, зареєстровані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

Штам *A. calcoaceticus* IMB В-7241 культивували в рідкому поживному середовищі (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Розчин мікроелементів містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; H_3BO_3 — 0,006; KI — 0,0001; ЕДТА (трилон Б) — 0,5.

N. vaccinii IMB В-7405 культивували в середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01. Додатково в середовище вносили дріжджовий автолізат (0,5 %, об'ємна частка).

Як джерело вуглецю використовували рафіновану соняшникову олію «Олейна» (Дніпропетровський олійно-екстракційний завод), а також нерафіновану і відпрацьовану після смаження картоплі олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 2—4 % (об'ємна частка) і технічний гліцерин (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.) у концентрації 1—2 %.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини у вигляді супернатанту культуральної рідини (препарат 1) і розчину ПАР (препарат 2), екстрагованих з супернатанту сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) як описано раніше [7].

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [9]. Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів.

Як тест-культури використовували бактерії *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 та дріжджі *Candida albicans* Д-6 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Дослідження антиадгезивних властивостей ПАР здійснювали як описано у наших попередніх роботах [7]. Кількість адгезованих клітин (адгезія) визначали спектрофотометричним методом як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР (супернатант, розчин ПАР) матеріалів (пластик, кахель, сталь, лінолеум) до оптичної густини контрольних зразків (без обробки ПАР) і виражали у відсотках.

Результати та обговорення. Показники синтезу ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *N. vaccinii* IMB В-7405 на промислових відходах наведено у табл. 1.

Результати досліджень показують, що максимальна концентрація ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *N. vaccinii* IMB В-7405 (4,35 і 4,08 г/л відповідно) спостерігалася на середовищі з відпрацьованою після смаження картоплі олією, що вказує на перевагу використання такого субстрату у порівнянні з очищеним.

Нині відпрацьовані олії регенерують хімічним шляхом, використовують для виготовлення фарб та виробництва біопалива [10]. Однак відсоток використання їх у лакофарбній та енергетичній сферах залишається дуже малим через наявність канцерогенних речовин. Тому

перспективним залишається використання таких відходів для одержання мікробних ПАР. Так, *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 на середовищі з 2% соняшникової олії синтезує 0,7 г/л [11]. Значно вищі показники синтезу спостерігали при культивуванні *P. aeruginosa* ATCC 10145 на середовищі з 5% соняшникової олії: концентрація ПАР становила 5,08 г/л [12].

Таблиця 1. Синтез ПАР у процесі вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. vaccinii* IMB B-7405 олієвмісних субстратах і технічному гліцерині

Субстрат	ПАР, г/л		E ₂₄ , %	
	IMB B-7405	IMB B-7241	IMB B-7405	IMB B-7241
Рафінована олія	2,72±0,13	3,4±0,17	49	65
Нерафінована олія	4,08±0,20	2,35±0,12	50	53
Олія після смаження картоплі	4,72±0,23	3,85±0,19	48	69
Технічний гліцерин	2,61±0,13	1,41±0,07	51	78

Примітка. Концентрація олії та технічного гліцерину у середовищі культивування штаму IMB B-7405 — 2 % (об'ємна частка), концентрація олієвмісних субстратів для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 — 4 %, технічного гліцерину — 1 %. При визначенні індексу емульгування похибка не перевищувала 5%.

У той же час у доступній літературі нам не вдалося знайти інформацію про синтез ПАР представниками роду *Nocardia* і *Acinetobacter* на олієвмісних субстратах, у тому числі й на відпрацьованих оліях.

На наступному етапі досліджували антимікробні та антиадгезивні властивості синтезованих метаболітів (табл. 2). Експерименти показали, що мінімальна інгібуюча концентрація щодо досліджуваних бактерій і дріжджів ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих на промислових відходах, становила 8—68 мкг/мл, що перебуває в межах, визначених для відомих з літератури мікробних ПАР. Так, штам *B. subtilis* 109GGC020 синтезує ліпопептид, що у концентрації 16—64 мг/мл пригнічує ріст грам негативних (*P. aeruginosa*) та грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*) бактерій відповідно [13].

Таблиця 2. Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин штамів IMB B-7241 та IMB B-7405

Тест-культура	МІК (мкг/мл) ПАР, синтезованих	
	<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	11	9
<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	67	34
<i>E. coli</i> IEM-1	8	34
<i>C. albicans</i> Д-6	33	68

Примітка табл. 2 і 3. Штам IMB B-7405 вирощували на відпрацьованій після смаження картоплі олії, а IMB B-7241 — на технічному гліцерині. Під час визначення мінімальної інгібуючої концентрації похибка не перевищувала 5 %

Поверхнево-активні речовини, синтезовані штамом IMB B-7241 на технічному гліцерині, виявилися ефективнішими щодо вегетативних і спорових клітин *B. subtilis* БТ-2 (МІК 9—34 мкг/мл), ніж ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, отримані на відпрацьованій олії (табл. 2). Зазначимо, що МІК цих ПАР є на порядки нижчими ніж наведені у літературних джерелах.

У таблиці 3 наведені дані щодо адгезії досліджуваних тест-культур на абіотичних поверхнях після обробки препаратами поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB B-7405 та *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Експерименти показали, що антиадгезивний ефект препаратів ПАР штамів IMB B-7405 та IMB B-7241 залежав від фізіологічного стану тест-культури (вегетативні та спорові клітини *B. subtilis* БТ-2), ступеня очищення ПАР та типу абіотичної поверхні (табл. 3).

ПАР, синтезовані *N. vaccinii* IMB B-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії, у концентрації 0,04 мг/мл, знижували адгезію бактерій (*E. coli* IEM-1, *B. subtilis* БТ-2) на пластику, кахелі, склі та лінолеумі на 25—90, а дріжджів *C. albicans* Д-6 — на 15—65 %. ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на гліцерині, виявилися ефективнішими антиадгезивними агентами, ніж ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405. Ефективна концентрація поверхнево-активних речовин штаму IMB B-7241 була на порядок нижчою (0,005 мг/мл): після обробки цими препаратами кількість прикріплених до абіотичних поверхонь клітин бактерій становила у середньому 20—45 %, а клітин дріжджів — 25—40 %. Порівняння

отриманих даних з літературними показало, що ефективна концентрація ПАР штамів ІМВ В-7405 та ІМВ В-7241 є на порядки нижчою, ніж описана у літературі. Так, при використанні синтезованих на гексадекані препаратів ПАР *P. aeruginosa* LCD12 (8—64 мг/мл), адгезія *B. subtilis* R16 на пластиковій поверхні становила 80—50 % [15]. Обробка поверхні пластику препаратами поверхнево-активними речовин *B. subtilis* spp. у концентрації 3—50 мг/мл супроводжувалася зниженням адгезії клітин *E. coli* Е-8 на 89 % [16].

Таблиця 3. Адгезія деяких мікроорганізмів на абіотичних поверхнях після обробки ПАР ІМВ В-7241 та ІМВ В-7405

Препарати	Абіотичні поверхні	Продуценти	Адгезія (%)			
			<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>C. albicans</i> Д-6
1 супернатант	пластик	<i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241	26	75	62	34
	лінолеум		21	51	63	43
	кахель		33	45	65	28
	сталь		20	38	57	40
2 розчин ПАР	пластик		28	29	38	23
	лінолеум		25	46	33	25
	кахель		38	40	30	20
	сталь		25	22	35	23
1 супернатант	пластик	<i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405	26	15	42	81
	лінолеум		60	16	53	68
	кахель		44	18	41	86
	сталь		57	17	32	57
2 розчин ПАР	пластик		28	28	39	69
	лінолеум		60	53	45	84
	кахель		44	18	69	67
	сталь		44	35	43	54

Висновок. Отже, результати проведеної роботи показали, що поверхнево-активним речовинам синтезованим *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах, притаманні високі антиадгезивні та антимікробні властивості, що дає змогу рекомендувати їх для практичного використання як складових мийних та антимікробних засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Mandal S.M. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry / S.M. Mandal, A.E. Barbosa, O.L. Franco // *Biotechnol. Adv.* — 2013. — Vol. 31, № 5. — P. 338–345. — doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.004
2. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production / I. Batan, S. Satputeal, R. Patil [et al.] // *Front Microbiol.* — 2014. — Vol. 5. — doi: 10.3389/fmicb.2014.00697
3. Синтез поверхностно активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на промышленных отходах / Т.П. Пирог [и др.]. // *Микроб.журн.* — 2014. — Т. 76, № 2. С.17–23.
4. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас -5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 on by product of biodiesel product / T. Pirog [et al.] // *Food Bioprod. Proces.* — 2013. — doi:10.1016/j.fbp.2013.09.003.
5. Joshi-Navare, K. Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive / K. Joshi-Navare, P. Khanvilkar, A. Prabhune. // *Biochem.* — 2013. — Vol. 1, N 10. — P. 15–24.
6. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate / F.R. Accorsini [et al.] // *Braz J Microbiol.* — 2012. — doi: 10.1590/S1517-838220120001000013/
7. Antiadhesive properties of the surfactants of *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, and *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 / Т.П. Пирог [et al.] // *Microbiology.* — 2014. — Vol. 83, N 6. — P. 732–739.

8. Singh A.K. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp. strain AR2 / A.K. Singh, R. Rautel, S.S. Cameotra // Microb. Cell. Fact. — 2014. — 13:67. — doi: 10.1186/1475-2859-13-67.
9. Determination of minimum inhibitory concentrations / J. Andrews // J. Antimicrob. Chemother. — 2001. — Vol. 48, N 1. — P. 5—16.
10. Сухенко Ю.Г. Биотопливо из отходов предприятий ресторанного хозяйства / Ю.Г. Сухенко, М.М. Муштрук, О.В. Глоба // Научный мир. — 2015. — Т. 5, №2. С.17–21.
11. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for exsitu enhanced oil recovery / H. Amani [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2013. — Vol. 170, № 2. — P. 1080—1093
12. Use of some carbon sources by *Pseudomonas* strains for synthesizing polyhydroxyalkanoates and/or rhamnolipids / M.C. Doina [et al.] // Rom. Biotechnol. Let. — 2014. — Vol. 19, №3. — P. 9400—9408.
13. Gageostatins A-C, antimicrobial linear lipopeptides from a marine *Bacillus subtilis* / F.S. Tareq [at al.] // Mar. Drugs. — 2014. — Vol.12. — P. 871—885. — doi: 10.3390/md12020871
14. Das P. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity / P. Das, X. Yang, L. Ma // Front. Microbiol. — 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00696.
15. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens / F. Rivardo [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — Vol. 83, № 1. — P. 541—553.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* ИМВ В-7405 И *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДАХ

Л. Никитюк, И. Павлюковец, И. Севенко

Национальный университет пищевых технологий

Исследовали антимикробные и антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтезированных *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 и *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-724 на отработанном подсолнечном масле и техническом глицерине. Установлено, что после обработки абиотических поверхностей (пластик, кафель, сталь, поливинилхлорид) препаратами ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (0,04 мг/мл) и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в более низкой (0,005 мг/мл) концентрации, адгезия бактерий (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2) и дрожжей (*Candida albicans* Д-6) составляла в среднем 15—86 %, а минимальная ингибирующая концентрация по отношению к исследуемым бактериям и дрожжам ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных на промышленных отходах, находилась в пределах 8—68 мкг/мл.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 микробные поверхностно-активные вещества, антиадгезивные агенты, антимикробные свойства, биопленка.