

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 SURFACTANTS, SYNTHESIZED IN THE PRESENCE OF BIOLOGICAL INDUCTORS**T. Pirog, M. Ivanov, H. Yarova***National University of Food Technologies*

Key words:

Surfactants
Minimum inhibitory concentrations
Competitive microorganisms
Co-cultivation

Article history:

Received 23.07.2021
Received in revised form 06.08.2021
Accepted 19.08.2021

Corresponding author:

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

ABSTRACT

The aim of this work was to study the antimicrobial activity of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants synthesized in the presence of biological inducers in medium with glycerol of various purification levels. Live *Bacillus subtilis* BT-2 cells and cells inactivated by autoclaving were used as inducers, as well as the supernatant after growing the BT-2 strain. Inductors were introduced in amount of 2.5—10% (v/v) into a medium with purified glycerol and waste of biodiesel production in the beginning of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 cultivation. The antimicrobial activity of surfactants against bacterial and yeast cultures was determined by the indicator of the minimum inhibitory concentration.

It was found that the most effective inducers were living cells of *B. subtilis* BT-2: their introduction into the medium with both substrates was accompanied by the synthesis of surfactants, the minimum inhibitory concentrations of which in relation to the studied bacterial test cultures (*Bacillus subtilis* BT-2, *Staphylococcus aureus* BMS-1, *Proteus vulgaris* PA-12, *Enterobacter cloacae* C-8) and yeast (*Candida albicans* D-6, *Candida tropicalis* PE-2) were 2.5—23 times lower than those established for surfactants formed in a medium without this inducer. The use of inactivated *B. subtilis* BT-2 cells as an inducer allowed to increase the antimicrobial activity of surfactants in relation to bacteria and yeast by 2—8 times, in the presence of *B. subtilis* BT-2 supernatant surfactants were synthesized, the antimicrobial activity of which in relation to bacteria was only twice high as surfactants obtained without an inducer.

This data may indicate that the inducing factor is associated with cells, and induction requires both chemical and biological interaction between the surfactant producer and a competitive microorganism.

So, as a result of the work, the possibility of regulating the antimicrobial activity of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants was established when the competitive bacteria *B. subtilis* BT-2 is added to the culture medium. It is important that under such cultivation conditions, the antimicrobial activity of surfactants synthesized on toxic industrial waste of biodiesel production were significantly increased.

DOI: 10.24263/2225-2924-2021-27-4-6

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241, СИНТЕЗОВАНИХ ЗА НАЯВНОСТІ БІОЛОГІЧНИХ ІНДУКТОРІВ

Т. П. Пирог, М. С. Іванов, Г. А. Ярова

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено антимікробну активність ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення. Як індуктори використовували живі та інактивовані автоклавуванням клітини *Bacillus subtilis* БТ-2, а також супернатант після вирощування штаму БТ-2, які вносили у кількості 2,5—10% (об'ємна частка) у середовище з очищеним гліцерином і відходами виробництва біодизелю на початку процесу культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Антимікробну активність ПАР щодо бактеріальних і дріжджових культур визначали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).

Встановлено, що найефективнішими з використовуваних індукторів виявилися живі клітини *B. subtilis* БТ-2: внесення їх у середовище з обома субстратами супроводжувалося синтезом ПАР, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо досліджуваних бактеріальних тест-культур (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Enterobacter cloacae* С-8) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) були в 2,5—23 рази нижчими, ніж встановлені для поверхнево-активних речовин, утворених на середовищі без цього індуктора. Використання як індуктора інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 дало змогу підвищити антимікробну активність ПАР щодо бактерій і дріжджів у 2—8 разів, за наявності супернатанту *B. subtilis* БТ-2 синтезувалися ПАР, антимікробна активність яких щодо бактерій була всього вдвічі вищою, ніж поверхнево-активних речовин, одержаних без індуктора.

Ці дані можуть свідчити про те, що індукуючий фактор пов'язаний з клітинами, а індукція потребує як хімічної, так і біологічної взаємодії між продуцентом ПАР та конкурентним мікроорганізмом.

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено можливість регуляції антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 внесенням у середовище культивування продуцента клітин конкурентних бактерій *B. subtilis* БТ-2. Важливо, що за таких умов культивування суттєво підвищувалася антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих на токсичних промислових відходах виробництва біодизелю.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, мінімальні інгібуючі концентрації, конкурентні мікроорганізми, спільнекультивування.

Постановка проблеми. Станом на початок серпня 2021 р. в інформаційній базі PubMed виявлено 1918 посилань з ключовим словом «co-cultivation» і

9258 — «co-culture antimicrobial» (pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Інтерес до такого спільного культивування продуцентів антимікробних сполук з конкурентними мікроорганізмами в останнє десятиліття зумовлений такими причинами:

- по-перше, надмірне та необґрунтоване використання антибіотиків стало однією з причин збільшення стійкості патогенних бактерій до цих лікарських засобів, а ВООЗ визначила проблему антибіотикорезистентності як найгострішу проблему людства (Ahmad & Khan, 2019; Merker та ін., 2020; Lin та ін., 2021);

- по-друге, підвищення антибіотикорезистентності патогенних мікроорганізмів стимулювало пошук альтернативних антибіотикам речовин природного походження, якими є нетоксичні біодеградабельні мікробні поверхнево-активні речовини (Ceresa, Fracchia, Fedeli, Porta & Banat, 2021);

- по-третє, в результаті спільного культивування продуцентів антимікробних сполук з конкурентними мікроорганізмами (біологічними індукторами) відбувається не тільки підвищення антимікробної активності та/або синтезу цільового продукту (Matevosyan, Bazukya & Trchounian, 2019; Abdel-Wahab та ін., 2019), а й навіть утворення нових метаболітів, нехарактерних для монокультури-продуцента (Stierle та ін., 2017; Hoshino, Wong, Ozeki & Zhang, 2018).

Раніше було встановлено, що *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 синтезує комплекс поверхнево-активних аміно- і гліколіпідів на широкому спектрі вуглецевих субстратів, у тому числі й на очищеному гліцерині та відходах виробництва біодизелю (Pirog, Lutsai & Muchnyk, 2021). Разом з тим дослідження біологічної активності ПАР, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, показало, що такі поверхнево-активні речовини виявилися менш ефективними антимікробними агентами порівняно з утвореними на очищеному гліцерині та етанолі (Pirog, Lutsay, Kliuchka & Beregova, 2019).

Інтерес до відходів виробництва біодизелю зумовлений тим, що проблемою сьогодення є необхідність утилізації великої кількості токсичних промислових відходів. Одним з найефективніших способів знешкодження таких відходів є використання їх як субстратів для культивування мікроорганізмів з метою одержання практично цінних продуктів, зокрема поверхнево-активних речовин, що дасть змогу суттєво знизити собівартість цільового продукту і підвищити ефективність біотехнологічного виробництва (Crosse, Brady, Zhou & Rumbold, 2019).

На нашу думку, підвищити антимікробну активність ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих на відходах виробництва біодизелю, можна у разі спільного культивування продуцента з конкурентними бактеріями, хоча наявність у складі цього субстрату токсичних сполук може негативно впливати на такі мікроорганізми.

Мета статті: дослідити антимікробну активність ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, синтезованих за наявності біологічних індукторів у середовищі з гліцерином різного ступеня очищення.

Матеріали і методи. Основним об'єктом досліджень був виділений із забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 (Pirog, Shevchuk, Voloshina & Gregirchak, 2005). Штам *A. calcoaceticus* K-4 зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України за номером IMB B-7241.

Як тест-культури під час визначення антимікробної активності ПАР використовували штами бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Enterobacter cloacae* С-8) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій. Вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснювали в рідкому середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35, NaCl — 1,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, вода дистильована — до 1 л, рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1% (об'ємна частка), що 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. Як джерела вуглецю використовували (% об'ємна частка): очищений гліцерин — 3, відходи виробництва біодизелю — 5, концентрації гліцерину різної якості еквімолярні за вуглицем.

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

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

Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за наявності супернатанту, живих і інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 і без індукторів здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 7 діб.

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований метод Блая і Даєра (Bligh & Dyer, 1959) після екстракції їх сумішню хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв.

Оскільки *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів, а відомий метод Блая і Даєра, використовуваний 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 дає змогу 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) й 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 й упарювали на роторному випарнику IP-1M2 при 50°C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

У дослідженнях як препарати використовували розчини поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 різної концентрації. Для цього сухий залишок ПАР розчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0) до вихідного об'єму (25 мл) і далі розводили цим буфером до необхідної концентрації. Розчини ПАР стерилізували в автоклаві при 112°C впродовж 30 хв.

Антимікробну активність поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) (Chebbi та ін., 2017). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища, у першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішували, відбирали 1 мл і переносили в наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становив 1 мл (МПБ чи сусло і розчин поверхнево-активних речовин), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася вдвічі. Як контроль використовували 1 мл МПБ (для бактерій) або сусла (для дріжджів) без додавання розчину ПАР. Далі у кожну з пробірок вносили по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 — 10^6 КУО/мл) та перемішували. Пробірки інкубували впродовж 24 год при 28—30°C для бактерій та 24—26°C для дріжджів. 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.

Усі досліди проводили в 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано раніше (Pirog, Shevchuk, Voloshina & Gregirchak, 2005). Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. Дослідження щодо впливу конкурентних мікроорганізмів на синтез антимікробних сполук можна умовно поділити на три групи:

1) обидва штами (і продуцент, і конкурентний мікроорганізм) вносять у середовище культивування антимікробних метаболітів у співвідношенні 1:1, тобто у практично однаковій концентрації (Stierle та ін., 2017; Matevosyan, Bazukya & Trchounian, 2019);

2) живі або інактивовані клітини індуктора вносять у середовище у значно нижчій концентрації порівняно з клітинами продуцента цільових метаболітів Luti & Yonis, 2013; Rateb та ін., 2013);

3) як індуктор використовують супернатант (фільтрат) після вирощування конкурентного мікроорганізму (Rateb та ін., 2013; Wang, Yuan, Gu & Shi, 2013).

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

У своїх дослідженнях ми використовували як індуктор клітини *B. subtilis* БТ-2. Вибір був зумовлений тим, що в (Abdel-Wahab та ін., 2019; Vuijs та ін., 2021) зазначається, що під час спільного культивування відбувається імітація природних умов, і в боротьбі за субстрат активуються «мовчазні» гени, відповідальні за синтез сполук з антимікробною щодо конкурентного мікроорганізму активністю. Це справедливо насамперед для мікроорганізмів, виділених зі спільних місць існування. Тому як конкурентні мікроорганізми або індуктори для підвищення антимікробної активності антибіотиків, синтезованих ґрунтовими стрептоміцетами, дослідники обирали штами *B. subtilis*, які є типовими мешканцями таких місць існування (Luti & Mavituna, 2011; Liang та ін., 2019). Зазначимо, що продуцент ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 також ізольований нами з ґрунту (Pirog, Shevchuk, Voloshina & Gregirchak, 2005), як і представники роду *Bacillus*.

У табл. 1 наведено показники синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення за наявності біологічних індукторів.

Таблиця 1. Вплив біологічних індукторів на утворення поверхнево-активних речовин під час вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю

Субстрат для синтезу ПАР	Біологічний індуктор	ПАР, г/л
Очищений гліцерин (3%, об'ємна частка)	Контроль (без індуктора)	1,42±0,07
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,96±0,04
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,54±0,07
	Супернатант	1,44±0,07
Відходи виробництва біодизелю (5%, об'ємна частка)	Контроль (без індуктора)	2,52±0,12
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	3,56±0,17
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,32±0,11
	Супернатант	2,36±0,11

Наведені у табл. 1 дані свідчать про те, що за умов росту продуцента ПАР на обох субстратах наявність у середовищі індукторів у вигляді інактивованих клітин *B. subtilis* БТ-2 і супернатанту не впливала на концентрацію синтезованого цільового продукту, яка становила 1,41—1,54 і 2,32—2,52 г/л на очищеному гліцерині і відходах виробництва біодизелю відповідно. Внесення живих

клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовище з очищеним гліцерином супроводжувалося зниженням кількості ПАР в 1,5 раза (до 0,96 г/л) порівняно з показниками без індуктора, що може бути зумовлене конкуренцією індуктора і продуцента ПАР за субстрат і вищою швидкістю росту *B. subtilis* БТ-2 у таких умовах культивування. У той же час за наявності живих клітин *B. subtilis* БТ-2 у середовищі з відходами виробництва біодизелю спостерігали підвищення синтезу ПАР в 1,4 раза (до 3,56 г/л) порівняно з культивуванням *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на цьому субстраті без індуктора. На нашу думку, токсичні домішки у складі промислового відходу інгібували ріст індуктора, тоді як метанол, етанол, тригліцериди та жирні кислоти слугували додатковими джерелами вуглецю для продуцента ПАР.

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

Найменш ефективним з досліджуваних індукторів виявився супернатант: антимікробна щодо більшості бактеріальних тест-культур активність ПАР, синтезованих за його наявності, була всього вдвічі нижчою, ніж поверхнево-активних речовин, утворених без індуктора (табл. 2).

Таблиця 2. Антибактеріальна активність поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, синтезованих за дії біологічних індукторів

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

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6
Відходи виробництва біодизелю	Контроль (без індуктора)	9,8	4,9	9,8	19,6
	Живі клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,85	0,85	1,7	0,85
	Інактивовані клітини <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,2	2,2	2,2	4,4
	Супернатант	4,6	2,3	4,6	18,4

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

Таблиця 3. Вплив біологічних індукторів на антифунгальну активність поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині різного ступеня очищення

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

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

Дані щодо дослідження дії ПАР, синтезованих за наявності індукторів, на дріжджі роду *Candida* наведено у табл. 3. Ці дані свідчать про те, що використання як індукторів живих клітин *B. subtilis* БТ-2 супроводжувалося синтезом ПАР з найвищою антифунгальною активністю (МІК 1,87—7,0 мкг/мл), менш ефективними індукторами виявилися інактивовані клітини цих бактерій (МІК 2,8—9,0 мкг/мл), а супернатант у більшості випадків не спричиняв позитивної дії (МІК 11,2—18,4 мкг/мл). Лише внесення супернатанту в середовище з відходами виробництва біодизелю дало змогу підвищити вдвічі антимікробну щодо *C. Tropicalis* PE-2 активність синтезованих поверхнево-активних речовин.

Зазначимо, що й літературні дані щодо ефективності використання як індукторів живих, інактивованих клітин чи відповідного супернатанту дуже різняться. Так, у праці (Liang L. та ін., 2020) зазначається, що спектр метаболітів, синтезованих актинобактеріями за наявності живих клітин індукторів, був ширшим, ніж у разі використання інактивованих тепловою обробкою клітин. У той же час синтез фенозину *Pseudomonas aeruginosa* підвищувався практично

однаково незалежно від фізіологічного стану (живі чи інактивовані клітини) індукторів *Escherichia coli*, *B. subtilis* і *Saccharomyces cerevisiae* (Luti & Yonis, 2013). Використання як індуктора супернатанту *Streptomyces bullii* C2 не спричиняло позитивного впливу на синтез антимікробних сполук грибом *Aspergillus fumigatus* MBC-F1-10, у той час як за наявності живих клітин індуктора спостерігали синтез нових дев'яти антимікробних метаболітів, не утворюваних монокультурою продуцента (Rateb та ін., 2013). Wang із співавт. (Wang, Yuan, Gu & Shi, 2013) встановили, що супернатант *Penicillium chrysogenum* AS 3.5163 виявився ефективнішим індуктором синтезу антибіотика натаміцину штамом *Streptomyces natalensis* HW-2, ніж інактивовані автоклавуванням клітини гриба (підвищення концентрації антибіотика в 3,4 і 1,4 раза відповідно). Такі дані свідчать про різні механізми, що лежать в основі підвищення синтезу чи активності антимікробних сполук, синтезованих за дії індукторів.

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

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

Висновок

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено можливість регуляції антимікробної активності поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 внесенням у середовище культивування продуцента клітин конкурентних бактерій *B. subtilis* БТ-2. Важливо, що за таких умов культивування суттєво підвищується антимікробна активність поверхнево-активних речовин, синтезованих на токсичних промислових відходах виробництва біодизелю.

Література

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

Ahmad, M., Khan, A. U. (2019). Global economic impact of antibiotic resistance: a review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 313—316. doi:10.1016/j.jgar.2019.05.024.

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

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

Ceresa, C., Fracchia, L., Fedeli, E., Porta, C., Banat, I. M. (2021). Recent advances in biomedical, therapeutic and pharmaceutical applications of microbial surfactants. *Pharmaceutics*, 13(4), 466. doi: 10.3390/pharmaceutics13040466.

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

Crosse, A. J., Brady, D., Zhou, N., Rumbold, K. (2019). Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of “dirty” glycerol as an industrial fermentation substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 36(1), 2. doi: 10.1007/s11274-019-2776-9.

Hoshino, S., Wong, C. P., Ozeki, M., Zhang, H. (2018). Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *The Journal of Antibiotics*, 71(7), 653—657. doi:10.1038/s41429-018-0040-4.

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

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

Lin, Z., Yuan, T., Zhou, L., Cheng, S., Ou, X., Lu, P., Feng, Q. (2021). Impact factors of the accumulation, migration and spread of antibiotic resistance in the environment. *Environmental Geochemistry and Health*, 43(5), 1741—1758. doi: 10.1007/s10653-020-00759-0.

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

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

Merker, M., Tueffers, L., Vallier, M., Groth, E. E., Sonnenkalb, L., Unterweger, D., Baines, J. F., Niemann, S., Schulenburg, H. (2020). Evolutionary approaches to combat antibiotic resistance: opportunities and challenges for precision medicine. *Frontiers in Immunology*, 11, 1938. doi: 10.3389/fimmu.2020.01938.

Pirog, T. P., Lutsay, D. A., Kliuchka, L. V., Beregova, K. A. (2019). Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnologia Acta*, 12(1), 39—57. <https://doi.org/10.15407/biotech12.01.039>.

Pirog, T. P., Lutsai, D. A., Muchnyk, F. V. (2021). Biotechnological potential of the *Acinetobacter* genus bacteria. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 83(3), 65—82. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.03.092>.

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

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

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

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