

**ВЛИЯНИЕ КОНКУРЕНТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ  
АКТИВНОСТЬ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER  
CALCOACETICUS* ИМВ В-7241**

**Н.С. Иванов, А.А. Ярова, Т.П. Пирог**

*Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, info@nuft.edu.ua*

**Актуальность.** Резистентность к антибиотикам вызывает большую обеспокоенность, поскольку приводит к глобальным рискам для здоровья населения, а также экологическим рискам. Наличие в окружающей среде устойчивых к антибиотикам генов и устойчивых к антибиотикам бактерий существенно повышает распространение резистентности к антибиотикам [1].

Для решения этих проблем осуществляются исследования в нескольких направлениях: во-первых, поиск альтернативных антибиотикам веществ природного происхождения, к которым относятся и нетоксичные биodeградебельные микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ)

[2]; во-вторых, совместное культивирование продуцентов антимикробных соединений с конкурентными микроорганизмами (биологическими индукторами) для повышения антимикробной активности и/или синтеза целевого продукта [3,4].

Ранее было установлено, что *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 синтезирует комплекс поверхностно-активных амино- и гликолипидов на очищенном глицерине и отходах производства биодизеля. Культивирование штамма ИМВ В-7241 на отходах производства биодизеля сопровождалось повышением концентрации поверхностно-активных веществ в два раза, однако снижением их антимикробной и антиадгезивной активности по сравнению с выращиванием на очищенном глицерине [5].

Интерес к отходам производства биодизеля как субстрата для использования в биотехнологических процессах [6] обусловлен тем, что на сегодняшний день хранение этих токсичных промышленных отходов является потенциальной экологической проблемой из-за повышенной щелочности и содержания остатков токсичного метанола, высоких концентраций солей и свободных жирных кислот.

**Цель работы:** исследовать влияние конкурентных микроорганизмов на биологическую активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных на глицерине различной степени очистки.

**Изложение основных результатов исследования.** Штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 изолирован из загрязненной нефтепродуктами почвы [7]. В качестве индуктора использовали и почвенный штамм *Bacillus subtilis* БТ-2. Индуктор вносили в среду культивирования продуцента ПАВ в виде живых или инактивированных автоклавированием клеток, а также в виде супернатанта.

В табл. 1 представлены данные по действию на бактерии поверхностно-активных веществ, синтезированных *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в присутствии индукторов. Эти данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективным индуктором оказались живые клетки *B. subtilis* БТ-2: внесение их в среду с обоими субстратами сопровождалось синтезом ПАВ, минимальные ингибирующие концентрации которых по отношению к бактериальным тест-культурам были в 2-20 раз ниже, чем установленные для поверхностно-активных веществ, полученных без индуктора.

Использование в качестве индуктора инактивированных клеток *B. subtilis* БТ-2 позволило повысить антимикробную активность ПАВ по отношению к бактериям в 2-8 раз по сравнению с показателями для поверхностно-активных веществ, синтезированных в среде без индуктора. Отметим, что ПАВ, полученные в присутствии *B. subtilis* БТ-2, характеризовались высокой антимикробной активностью не только по отношению к этому биологическому индуктору, но и другим грамположительным (*S. aureus* БМС-1) и грамотрицательным (*P. vulgaris* ПА-12, *E. cloacae* С-8) бактериям. Наименее эффективным из исследуемых индукторов оказался супернатант: антибактериальная активность ПАВ, синтезируемых в его присутствии, была ниже, чем препаратов, полученных при наличии в среде культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 живых и инактивированных клеток *B. subtilis* БТ-2 (табл. 1)

Таблица 1. – Антибактериальная активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных при наличии биологических индукторов

Субстрат для синтеза ПАВ	Биологический индуктор	Минимальные ингибирующие концентрации (мкг/мл) по отношению			
		<i>Bacillus subtilis</i> БТ-2 (споры)	<i>Staphylococcus aureus</i> БМС-1	<i>Proteus vulgaris</i> ПА-12	<i>Enterobacter cloacae</i> С-8
Очищенный глицерин	Контроль (без индуктора)	2,8	2,8	5,6	5,6
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,23	0,23	1,84	0,46
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,4	1,4	1,4	0,7
	Супернатант	1,4	2,8	2,8	1,4

## Окончание таблицы 1

Отходы производства биодизеля	Контроль (без индуктора)	9,8	4,9	9,8	19,6
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	0,85	0,85	1,7	0,85
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,2	2,2	2,2	4,4
	Супернатант	4,6	2,3	4,6	18,4

Примечание – При определении минимальных ингибирующих концентраций погрешность не превышала 5%.

Данные по исследованию действия ПАВ, синтезированных в присутствии индукторов, на дрожжи рода *Candida* представлены в табл. 2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование в качестве индукторов живых клеток *B. subtilis* БТ-2 сопровождалось синтезом ПАВ с высокой антифунгальной активностью (МИК 1,87-7,0 мкг/мл), менее эффективными индукторами оказались инактивированные клетки (МИК 2,8-9,0 мкг/мл), а супернатант практически не оказывал положительного эффекта на антифунгальную активность синтезированных в его присутствии ПАВ.

Таблица 2. – Антифунгальная активность поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, синтезированных при наличии биологических индукторов

Субстрат для синтеза ПАВ	Биологический индуктор	Минимальные ингибирующие концентрации (мкг/мл) по отношению	
		<i>Candida tropicalis</i> PE-2	<i>Candida albicans</i> Д-6
Очищенный глицерин	Контроль (без индуктора)	11,2	11,2
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	1,87	3,75
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	2,8	5,6
	Супернатант	11,2	11,2
Отходы производства биодизеля	Контроль (без индуктора)	19,7	19,7
	Живые клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	3,5	7,0
	Инактивированные клетки <i>Bacillus subtilis</i> БТ-2	4,5	9,0
	Супернатант	9,2	18,4

Примечание – При определении минимальных ингибирующих концентраций погрешность не превышала 5%.

Отметим, что и литературные данные по эффективности использования в качестве индукторов живых, инактивированных клеток или соответствующего супернатанта существенно отличаются. Так, в работе [8] отмечается, что спектр метаболитов, синтезированных актинобактериями в присутствии живых клеток индукторов, был шире, чем при использовании инактивированных тепловой обработкой клеток.

Использование живых клеток *Pseudomonas* sp. в качестве индукторов при культивировании *Streptomyces* sp. МА37 сопровождалось образованием нескольких новых метаболитов, не синтезированных монокультурами [9]. В то же время синтез феназина *Pseudomonas aeruginosa* повышался практически одинаково независимо от физиологического состояния (живые или инактивированные клетки) индукторов *Escherichia coli*, *B. subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Использование в качестве индуктора супернатанта *Streptomyces bullii* C2 не оказывало положительного влияния на синтез антимикробных веществ грибом *Aspergillus fumigatus* МВС-F1-10, в то время как при наличии живых клеток индуктора наблюдали синтез девяти новых антимикробных метаболитов, не хаарктерных для монокультуры продуцента. Такие данные свидетельствуют о различных механизмах, лежащих в основе повышения синтеза или активности антимикробных веществ, синтезированных при действии индукторов.

Полученные нами данные по более высокой эффективности живых клеток индуктора по сравнению с инактивированными или супернатантом могут свидетельствовать о том, что индуцирующий фактор связан с клетками, а индукция требует как химического, так и биологического взаимодействия между продуцентом ПАВ и конкурентным микроорганизмом.

**Вывод.** Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность регуляции антимикробной активности поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 внесением в среду культивирования продуцента клеток конкурентных бактерий *B. subtilis* БТ-2. Важно, что в таких условиях культивирования существенно повышается антимикробная активность поверхностно-активных веществ, синтезированных на токсичных промышленных отходах производства биодизеля.

#### Список использованных источников

1. Lin, Z., Yuan, T., Zhou, L., Cheng, S., Qu, 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.
2. 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.
3. Alves A.R., Sequeira A.M., Cunha Â. (2019). Increase of bacterial biosurfactant production by co-cultivation with biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. Doi: 10.1111/lam.13169.
4. Hifnawy S.M., Hassan H.M., Mohammed R., Fouda M.M., Sayed A.M., Hamed A.A., Abdelmohsen U.R. (2020). Induction of Antibacterial Metabolites by Co-Cultivation of Two Red-Sea-Sponge-Associated Actinomycetes *Micromonospora* sp. UR56 and *Actinokinespora* sp. EG49. *Marine Drugs*, 18(5), 243. doi: 10.3390/md18050243.
5. Pirog, T.P., Lutsay, D.A., Kliuchka, L.V., Beregova, K.A. (2019). Antimicrobial activity of surfactants of microbial origin. *Biotechnology Acta*, 12(1), 39–57. doi: 10.15407/biotech12.01.039.
6. Hasan M.M., Rahman M.M. (2017). Performance and emission characteristics of biodiesel–diesel blend and environmental and economic impacts of biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 74, 938–948. doi: 10.1016/j.rser.2017.03.045.
7. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. (2009). Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К–4 на синтез поверхностно–активных веществ. *Прикл. биохимия и микробиология*. 45 (3): 304-310.
8. 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.
9. Maglangit F., Kyeremeh S., Ebel D. (2020). A Co-Culturing Approach Enables Discovery and Biosynthesis of a Bioactive Indole Alkaloid Metabolite. *Molecules*, 25(2), 256. Doi:10.3390/molecules25020256
10. 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.
11. Rateb, M.E., Hallyburton, I., Housen, 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.