

АНТИАДГЕЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017

Изучено влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 различной степени очистки на прикрепление бактерий (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2, *Proteus vulgaris* BT-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* AC-22, *Erwinia aroidaeeae* Б-433), дрожжей (*Candida albicans* Д-6) и микромицетов (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium cultorum* Т-7) к абиотическим поверхностям (стекло, пластик, керамика, сталь, линолеум).

Установлена зависимость адгезии микроорганизмов на исследуемых материалах от степени очистки ПАВ (супернатант, раствор очищенных ПАВ), концентрации ПАВ (0,04–1,25 мг/мл), типа поверхности и тест-культур. Адгезия клеток большинства исследуемых бактерий после обработки абиотических поверхностей супернатантом культуральной жидкости, содержащей ПАВ в концентрации 0,06–0,25 мг/мл, составляла в среднем 20–45, дрожжей *C. albicans* Д-6 – 30–75 % и была ниже, чем при использовании растворов очищенных ПАВ аналогичной концентрации.

Более высокая антиадгезивная активность супернатанта по сравнению с растворами очищенных ПАВ свидетельствует о возможности исключения дорогостоящей стадии выделения и очистки при получении препаратов с антиадгезивными свойствами.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, поверхностно-активные вещества, адгезия микроорганизмов, абиотические поверхности.

Согласно данных Всемирной организации охраны здоровья по состоянию на 2011 г. гнойно-воспалительные заболевания ежегодно являются причиной смертности около 20 млн. человек, в том числе и 8 млн. детей [5]. Развитие более 65 % инфекционных заболеваний обусловлено формированием биопленок как *in vivo*, так и на/в абиогенных объектах, используемых в медицине (катетеры, протезы, имплантаты). Значительной проблемой является биопленкообразование микроорганизмами, контаминирующими продовольственное сырье, облицовку и покрытие производственных помещений, упаковочные материалы в пищевой промышленности [5, 15, 22].

Известно, что микроорганизмы в составе биопленок характеризуются более высокой устойчивостью к ряду физических, химических и биотических факторов окружающей среды [3, 4, 7, 9, 12, 23]. Так, из уретральных катетеров выделен штамм *Candida albicans* DS-295, резистентность которого к флуконазолу была в 4000 раз выше, чем у суспензионной культуры [4].

Адгезия микроорганизмов является первичным этапом образования биопленок. Потому актуальным является поиск веществ, способных предотвращать этот процесс и тем самым влиять на биопленкообразование бактериальных и грибных патогенов.

Современные технологии разрушения микробных биопленок предусматривают использование механических, физических, химических и биологических методов [8, 14]. В последние годы предпочтение отдается биологическим методам благодаря высокой эффективности, пролонгированности действия, безопасности для человека и окружающей среды.

В настоящее время проводятся активные исследования возможности практического использования поверхностно-активных веществ (ПАВ) микробного происхождения, поскольку они способны предотвращать образование биопленок, стимулировать их разрушение, а также характеризуются антимикробной активностью, стабильностью физико-химических свойств в широком диапазоне pH и температуры [11, 17, 18].

Ранее из загрязненных нефтью образцов почвы выделен штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 (IMB Ac-5017), синтезирующий ПАВ на гидрофобных и гидрофильных субстратах [1]. В предыдущих исследованиях установлены антимикробные свойства ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 по отношению к ряду бактериальных и дрожжевых культур [2].

Цель данной работы – исследование антиадгезивных свойств поверхностно-активных веществ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 различной степени очистки.

Материалы и методы. Объектом исследований являлся штамм *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, депонированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номером IMB Ac-5017, а также штаммы бактерий (*Escherichia coli* ИЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* БТ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Erwinia aroidaee* Б-433), дрожжей (*Candida albicans* Д-6) и микромицетов (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium cultorum* Т-7) из коллекции живых культур кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий.

R. erythropolis IMB Ac-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, pH 6,8–7,0, содержащей в качестве источника углерода подсолнечное масло (2 % по объему) [1]. В качестве посевного материала использовали культуру в экспоненциальной фазе роста, выращенную на среде указанного выше состава с 1 % (по объему) подсолнечного масла. Количество инокулята (10^4 – 10^5 клеток/мл) – 10 % от объема засеваемой среды.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 120 ч.

Получение препаратов поверхностно-активных веществ осуществляли следующим образом. Выросшие клетки отделяли центрифугированием (5000 г) в течение 45 мин, супернатант (**препарат 1**) подвергали дальнейшей обработке. Для этого 50 мл супернатанта помещали в цилиндрическую делительную воронку объемом 200 мл, добавляли 50 мл смеси Фолча (хлороформ и метанол в соотношении 2:1), воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали (экстрагировали поверхностно-активные липиды) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции, как описано выше. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 50 мл смеси Фолча, осуществляли экстракцию, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на роторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50 °С и абсолютном давлении 0,4 атм до постоянной массы. Сухой остаток растворяли в водопроводной воде до первоначального объема, получая **препарат 2**. Оставшаяся после экстракции ПАВ водная фаза условно названа нами **препарат 3**. Все препараты стерилизовали при 112 °С в течение 30 мин.

Концентрацию ПАВ в препаратах 1 и 2 устанавливали весовым методом после экстракции смесью Фолча.

Для исследования антиадгезивных свойств [18, 20, 21] очищенные пластинки исследуемых материалов (стекло, керамика, нержавеющая сталь, пластик, линолеум (поливинилхлорид)) одинакового размера (1 см²) стерилизовали при 112 °С в течение 40 мин, после чего помещали в раствор исследуемых препаратов 1–3 и высушивали в течение 24 ч в термостате при 30 °С. Односуточные тест-культуры бактерий, дрожжей и трехсуточные микромицетов, выращенные на мясо-пептонном (МПА) и глюкозо-картофельном агаре (ГКА) соответственно, суспендировали в 100 мл стерильной водопроводной воды, в суспензию помещали предварительно обработанные препаратами 1–3 и необработанные (контрольные) материалы, выдерживали 2 ч в термостате при 30 °С, после чего ополаскивали 10 мл стерильной водопроводной водой для удаления неадгезированных клеток.

Далее определяли степень адгезии клеток двумя методами.

Метод Коха [20, 21]. Исследуемые материалы помещали в колбы с 20 мл стерильной водопроводной воды и шариками бисера, встряхивали в течение 5 мин для удаления адгезированных клеток. В полученной суспензии определяли количество живых клеток по методу Коха на МПА (для бактерий) и ГКА (для дрожжей и микромицетов). Количество адгезированных клеток (адгезия) определяли как отношение клеток на предварительно обработанных препаратами 1–3 образцах к количеству клеток на контрольных образцах и выражали в процентах.

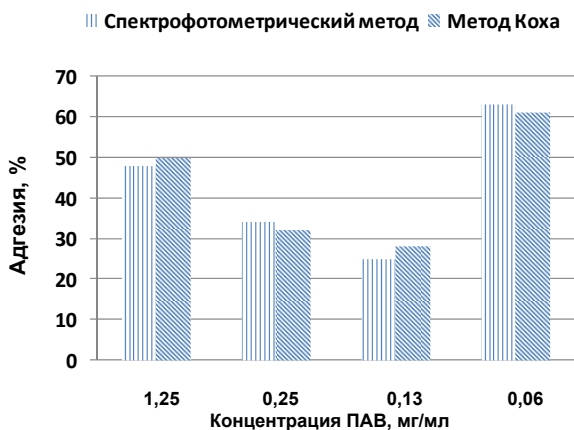
Спектрофотометрический метод [18, 20]. Пластинки материалов обрабатывали метанолом (99 %) в течение 15 мин для фиксации адгезированных клеток и высушивали при

комнатной температуре, после чего помещали на 5 мин в 1 % раствор генцианвиолета и ополаскивали водопроводной водой. После высушивания материалы обрабатывали 10 мл 33 % раствора уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность полученной суспензии. Количество адгезированных клеток (адгезия) определяли как отношение оптической плотности суспензии, полученной из обработанных препаратами 1–3 образцов к оптической плотности контрольных образцов и выражали в процентах.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину, как описано ранее [1]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Из литературы [18, 20, 21] известно, что в лабораторной практике степень адгезии микроорганизмов на различных поверхностях изучают с использованием метода Коха и спектрофотометрического метода (см. раздел «Материалы и методы»), причем последний метод является более простым и быстрым. В связи с этим на первом этапе определяли прикрепление клеток *E. coli* IEM-1 к керамической поверхности двумя методами (рисунок).

Как видно из представленных на рисунке данных, степень адгезии клеток, определяемая как методом Коха, так и спектрофотометрическим методом, была практически одинаковой после обработки керамической поверхности препаратом 1 (супернатант) с концентрацией ПАВ 0,06–1,25 мг/мл.



Адгезия *E. coli* IEM-1 на керамической поверхности, обработанной супернатантом культуральной жидкости *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (препарат 1)

В дальнейших исследованиях степень прикрепления бактериальных и дрожжевых клеток к различным материалам определяли спектрофотометрическим методом, а адгезию микромицетов – методом Коха, что обусловлено особенностями их морфологии.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что адгезия микроорганизмов на керамической поверхности зависела как от концентрации ПАВ в препаратах 1 и 2, так и от вида тест-культур микроорганизмов.

После обработки поверхности препаратом 1 (супернатант) количество прикрепленных клеток большинства исследуемых тест-культур было ниже, чем при использовании препарата 2 (раствор очищенных ПАВ), причем такая закономерность отмечалась особенно четко для низких концентраций ПАВ (0,06–0,13 мг/мл). Отметим, что обработка керамической поверхности препаратом 1 с концентрацией ПАВ 0,13 мг/мл сопровождалась снижением адгезии бактериальных и дрожжевых клеток в среднем на 70–75, а микромицетов – 35–45 % (табл. 1).

Из литературы [6] известно, что биологические свойства микробных ПАВ зависят от степени очистки. Так, липопептидный комплекс ПАВ *Bacillus circulans* состоит из шести фракций. Сравнение антимикробных свойств отдельных фракций и супернатанта культуральной жидкости показало более высокую эффективность комплексного препарата [6].

Влияние ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на прикрепление микроорганизмов к керамической поверхности

| Препарат | Концентрация, мг/мл | Адгезия клеток, % | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|
| | | <i>C. albicans</i> Д-6 | <i>B. subtilis</i> БТ-2 | <i>E. coli</i> ИЕМ-1 | <i>P. vulgaris</i> БТ-13 | <i>S. aureus</i> БМС-1 | <i>P. aeruginosa</i> П-55 | <i>E. cloacae</i> АС-22 | <i>E. aroideae</i> Б-433 | <i>A. niger</i> Р-3 | <i>F. cultorum</i> Т-7 |
| 1 | 1,25 | 50±2,5 | 45±2,3 | 48±2,4 | 90±4,5 | 88±4,4 | 19±1,0 | 89±4,5 | 95±4,7 | 84±4,2 | 93±4,7 |
| | 0,25 | 31±1,5 | 40±2,0 | 34±1,7 | 53±2,7 | 54±2,7 | 23±1,2 | 57±2,4 | 82±4,1 | 43±2,2 | 78±3,9 |
| | 0,13 | 26±1,3 | 25±1,3 | 25±1,3 | 28±1,4 | 32±1,6 | 29±1,5 | 95±5,0 | 35±1,7 | 56±2,8 | 65±3,3 |
| | 0,06 | 7±0,3 | 12±0,6 | 64±3,2 | 16±0,8 | 65±3,3 | 45±2,3 | 95±5,0 | 59±2,9 | 89±4,5 | 80±4,0 |
| 2 | 1,25 | 30±1,5 | 78±3,9 | 92±4,6 | 39±2,0 | 87±4,4 | 95±5,0 | 89±4,5 | 91±4,5 | 75±3,8 | 93±4,7 |
| | 0,25 | 23±1,1 | 70±3,5 | 88±4,4 | 35±1,8 | 82±4,1 | 86±4,3 | 71±3,6 | 78±3,9 | 80±4,0 | 85±4,3 |
| | 0,13 | 56±2,8 | 65±3,3 | 80±4,0 | 76±3,8 | 82±4,1 | 75±3,8 | 36±1,8 | 55±2,7 | 82±4,1 | 85±4,3 |
| | 0,06 | 89±4,4 | 57±2,9 | 50±2,5 | 93±4,7 | 89±4,5 | 54±2,7 | 57±2,9 | 65±3,2 | 88±4,4 | 90±4,5 |
| | 0,04 | 95±5,0 | 93±4,7 | 78±3,9 | 95±5,0 | 89±4,5 | 79±4,0 | 69±3,5 | 79±3,9 | 95±5,0 | 95±5,0 |

На адгезию микроорганизмов к различным поверхностям влияют как физические (заряд и структура материала-мишени), так и биологические факторы (состав клеточной стенки, наличие поверхностных структур, морфология клетки и др.) [10, 16].

Предполагается, что механизм антиадгезивного действия микробных ПАВ состоит в нарушении функции клеточной мембраны (повышение ее проницаемости) и изменении поверхностного заряда клетки [11, 16].

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что, как и на керамике, адгезия клеток исследуемых тест-культур на стекле снижалась после обработки поверхности препаратами 1 и 2, причем препарат 1 (супернатант) для большинства тест-культур оказался более эффективным антиадгезивным агентом, чем раствор очищенных ПАВ. Кроме того, снижение адгезии микроорганизмов на стекле на 50–80 % достигалось при более высокой концентрации ПАВ в препарате 1 (0,25 мг/мл), чем для обеспечения аналогичного антиадгезивного эффекта на керамической поверхности (0,13, а в некоторых случаях и 0,06 мг/мл, см. табл. 1).

Отметим, что антиадгезивное действие ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 проявлялось при концентрациях на порядок ниже, чем ПАВ *Bacillus cereus* NK1 [19]. Так, супернатант культуральной жидкости *B. cereus* NK1 (концентрация ПАВ 15 мг/мл) ингибировал формирование биопленки *Pseudomonas aeruginosa* на 55 % [19], в то время как аналогичный препарат штамма ИМВ Ас-5017 с концентрацией ПАВ 0,25 мг/мл снижал адгезию *P. aeruginosa* П-55 на стекле на 72 % (см. табл. 2).

Дальнейшие эксперименты показали, что препараты 1 и 2 штамма ИМВ Ас-5017 в концентрации 0,13–0,25 мг/мл снижали на 45–50 % количество прикрепленных к стальной поверхности клеток исследуемых тест-культур бактерий и грибов, причем в данном случае (в отличие от обработки керамической и стеклянной поверхности) эффективность обоих препаратов была практически одинаковой.

Литературные данные [24] свидетельствуют, что в настоящее время осуществляется активный поиск агентов, способных снижать адгезию микробных клеток на микропористых материалах (пластик). Установлено, что после обработки пластиковой поверхности раствором очищенных ПАВ, синтезируемых *P. aeruginosa* ЛВ1 (0,4 мг/мл), количество прикрепленных клеток *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *S. aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *L. monocytogenes* ATCC 19112 25, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* ATCC 4698, *L. monocytogenes* ATCC 191124, *S. aureus* ATCC 25923 та *M. luteus* ATCC 4698 составляло 20–30 % [24].

Адгезия некоторых микроорганизмов на стекле после обработки ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017

| Препарат | Концентрация, мг/мл | Адгезия клеток, % | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| | | <i>C. albicans</i> Д-6 | <i>B. subtilis</i> БТ-2 | <i>E. coli</i> ИЕМ-1 | <i>P. vulgaris</i> БТ-13 | <i>S. aureus</i> БМС-1 | <i>P. aeruginosa</i> П-55 | <i>E. cloacae</i> АС-22 | <i>E. aroidae</i> Б-433 | <i>A. niger</i> Р-3 | <i>F. cultorum</i> Т-7 |
| 1 | 1,25 | 10±0,5 | 30±1,5 | 55±2,8 | 70±3,5 | 18±0,9 | 38±1,9 | 95±5,0 | 56±2,8 | 37±1,9 | 45±2,3 |
| | 0,25 | 35±1,8 | 20±1,0 | 26±1,3 | 33±1,7 | 31±1,6 | 28±1,4 | 83±4,2 | 45±2,3 | 42±2,1 | 52±2,6 |
| | 0,13 | 43±2,2 | 16±0,8 | 35±1,8 | 33±1,7 | 92±4,6 | 47±2,4 | 91±4,6 | 63±3,2 | 57±2,9 | 61±3,1 |
| | 0,06 | 89±4,5 | 38±1,9 | 79±4,0 | 33±1,7 | 95±5,0 | 59±3,0 | 95±5,0 | 79±4,0 | 68±3,4 | 82±4,1 |
| 2 | 1,25 | 95±5,0 | 75±3,8 | 83±4,2 | 65±3,3 | 56±2,8 | 70±3,5 | 74±3,7 | 95±5,0 | 90±4,5 | 85±4,2 |
| | 0,25 | 88±4,4 | 63±3,2 | 70±3,5 | 42±2,1 | 45±2,3 | 66±3,3 | 78±3,9 | 85±4,2 | 90±4,5 | 85±4,2 |
| | 0,13 | 80±4,0 | 60±3,0 | 68±3,4 | 59±3,0 | 39±2,0 | 79±4,0 | 93±4,7 | 85±4,2 | 85±4,3 | 90±4,5 |
| | 0,06 | 95±5,0 | 86±4,3 | 74±3,7 | 70±3,5 | 25±1,3 | 85±4,3 | 95±5,0 | 90±4,5 | 95±5,0 | 95±5,0 |
| | 0,04 | 95±5,0 | 93±4,7 | 70±3,5 | 95±5,0 | 57±2,9 | 90±4,5 | 95±5,0 | 95±5,0 | 95±5,0 | 95±5,0 |

В табл. 3 представлены данные по влиянию ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на степень адгезии микроорганизмов к пластиковой поверхности. Результаты исследований показывают, что даже при снижении концентрации ПАВ в препаратах до 0,04–0,06 мг/мл они обладали антиадгезивными свойствами. Минимальная адгезия (около 10 %) наблюдалась для клеток *B. subtilis* БТ-2 и *S. aureus* БМС-1 после обработки пластиковой поверхности препаратом 1 (супернатант) с концентрацией ПАВ 0,06 и 0,13 мг/мл соответственно. Антиадгезивные свойства раствора очищенных ПАВ (препарат 2) были ниже, чем супернатанта культуральной жидкости, хотя обработка пластика этим препаратом (0,13–0,25 мг/мл) сопровождалась снижением адгезии клеток *P. aeruginosa* П-55 и *S. aureus* БМС-1 на 65–80 % (табл. 3). В работе [13] показано, что супернатант культуральной жидкости *Candida sphaerica* UCP 0995 (концентрация ПАВ 5–10 мг/мл) снижал адгезию на пластике бактерий рода *Lactobacillus* на 40–90, а *Staphylococcus* – на 20–97 %. Высокие антиадгезивные свойства ПАВ штамма ИМВ Ас-5017 по отношению к *S. aureus* БМС-1 (снижение адгезии к пластику на 80–90 %) проявлялись при концентрации ПАВ в препаратах 1 и 2 на порядок ниже (0,13 мг/мл, см. табл. 3), чем ПАВ *C. sphaerica* UCP 0995 [13].

Таблица 3

Влияние ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на прикрепление микроорганизмов к пластиковой поверхности

| Препарат | Концентрация, мг/мл | Адгезия клеток, % | | | | | | | | | |
|----------|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|
| | | <i>C. albicans</i> Д-6 | <i>B. subtilis</i> БТ-2 | <i>E. coli</i> ИЕМ-1 | <i>P. vulgaris</i> БТ-13 | <i>S. aureus</i> БМС-1 | <i>P. aeruginosa</i> П-55 | <i>E. cloacae</i> АС-22 | <i>E. aroidae</i> Б-433 | <i>A. niger</i> Р-3 | <i>F. cultorum</i> Т-7 |
| 1 | 1,25 | 52±2,6 | 55±2,8 | 58±2,9 | 95±5,0 | 19±1,0 | 52±2,6 | 58±2,9 | 54±2,7 | 95±5,0 | 80±4,0 |
| | 0,25 | 67±3,4 | 23±1,2 | 27±1,4 | 90±4,5 | 18±0,9 | 29±1,5 | 35±1,8 | 57±2,9 | 78±3,9 | 75±3,8 |
| | 0,13 | 88±4,4 | 18±0,9 | 39±2,0 | 50±2,5 | 10±0,5 | 13±0,7 | 44±2,2 | 85±4,3 | 82±4,1 | 88±4,4 |
| | 0,06 | 75±3,8 | 9±0,5 | 67±3,4 | 55±2,8 | 32±1,6 | 43±2,2 | 59±3,0 | 85±4,3 | 89±4,5 | 85±4,3 |
| 2 | 1,25 | 95±5,0 | 88±4,4 | 95±5,0 | 95±5,0 | 48±2,4 | 34±1,7 | 95±5,0 | 85±4,3 | 95±5,0 | 95±5,0 |
| | 0,25 | 95±5,0 | 75±3,8 | 80±4,0 | 95±5,0 | 35±1,8 | 18±0,9 | 76±3,8 | 89±4,5 | 95±5,0 | 95±5,0 |
| | 0,13 | 84±4,2 | 75±3,8 | 70±3,5 | 80±4,0 | 20±1,0 | 25±1,3 | 79±4,0 | 90±4,5 | 88±4,4 | 90±4,5 |
| | 0,06 | 80±4,0 | 70±3,5 | 68±3,4 | 85±4,3 | 33±1,7 | 35±1,8 | 85±4,3 | 93±4,7 | 95±4,8 | 92±4,6 |
| | 0,04 | 85±4,3 | 75±3,8 | 80±4,0 | 85±4,3 | 36±1,8 | 59±3,0 | 90±4,5 | 85±4,3 | 95±5,0 | 85±4,3 |

Последующие эксперименты показали, что препараты 1 и 2 *R. erythropolis* IMB Ac-5017 снижали на 50–70 % количество прикрепленных к поливинилхлоридной поверхности клеток исследуемых бактерий и дрожжей, а также на 20–40 % адгезию микромицетов.

Отметим, что и препарат 3 (водная фаза после экстракции ПАВ) обладал антиадгезивными свойствами, хотя и менее выраженными, чем препараты 1 и 2. Установлено, что после экстракции ПАВ из супернатанта культуральной жидкости последний не обладал поверхностно-активными свойствами, что позволяет утверждать об отсутствии ПАВ в препарате 3. Очевидно, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 синтезирует и другие, отличные от ПАВ, внеклеточные метаболиты с антиадгезивными свойствами. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Таким образом, препараты ПАВ *R. erythropolis* IMB Ac-5017 различной степени очистки (как в виде супернатанта, так и в виде раствора очищенных ПАВ) могут быть использованы для создания высокоэффективных препаратов, снижающих адгезию микроорганизмов на поверхности различных материалов.

*Т.П. Пирог^{1,2}, Н.А. Гриценко¹, А.Д. Конон¹,
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 ГСП, Д03680, Україна

АНТИАДГЕЗИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017

Резюме

Досліджували вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 різного ступеня очищення на прикріплення бактерій (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* БТ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Erwinia aroidaeae* Б-433), дріжджів (*Candida albicans* Д-6) і мікромицетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium cultorum* Т-7) до абіотичних поверхонь (скло, пластик, кераміка, сталь, полівінілхлорид).

Встановлено залежність адгезії мікроорганізмів на досліджуваних матеріалах від ступеня очищення ПАР (супернатант, розчин очищених ПАР), концентрації ПАР (0,04–1,25 мг/мл), типу поверхні і тест-культур. Адгезія клітин більшості досліджуваних бактерій після обробки абіотичних поверхонь супернатантом культуральної рідини з концентрацією ПАР 0,06–0,25 мг/мл становила у середньому 20–45, дріжджів *C. albicans* Д-6 – 30–75 % і була нижчою, ніж у разі застосування розчинів очищених ПАР аналогічної концентрації.

Вища антиадгезивна активність супернатанту порівняно з розчинами очищених ПАР засвідчує можливість виключення високовартісної стадії виділення та очищення під час одержання препаратів з антиадгезивними властивостями.

К л ю ч о в і с л о в а: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, поверхнево-активні речовини, адгезія мікроорганізмів, абіотичні поверхні.

ANTIADHESIVE POTENCIAL OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017 BIOSURFACTANTS

Summary

The effect of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 biosurfactants (surface-active substances, SAS) with different degree of purification on attachment of bacteria (*Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Proteus vulgaris* БТ-1, *Staphylococcus aureus* БМC-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* AC-22, *Erwinia aroidaeae* Б-433), yeasts (*Candida albicans* Д-6) and fungi (*Aspergillus niger* P-3, *Fusarium cultorum* T-7) to the abiotic surfaces (glass, plastic, ceramics, steel, linoleum) was studied.

The dependence of microorganisms adhesion on degree of SAS purification (supernatant, purified SAS solution), SAS concentration (0,04–1,25 mg/ml), type of surface and test-cultures. The adhesion of majority investigated bacterial cells after treatment of abiotic surfaces with supernatant of cultural liquid with SAS concentration 0,06–0,25 mg/ml was on the average 20–45, yeasts *C. albicans* Д-6 – 30–75 % and was less than that purified SAS solution with the same concentration.

Higher antiadhesive activity of supernatant as compared to purified SAS solution testifies to possibility of exception of the expensive stage of isolation and purification at obtaining of preparations with antiadhesive properties

Key words: Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017, surfactants, adhesion of microorganisms, abiotic surfaces.

1. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пірог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
2. Пірог Т.П., Конон А.Д., Софілканч А.П., Скочко А.Б. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікроб. журнал. – 2011. – 74, № 3. – С.14–20.
3. Abdallah S.A., Al-Asfoor K.K., Salama M.F., Al-Awadi B.M. Prospective analysis methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its risk factors // J. Glob. Infect. Dis. – 2013. – 5, N 1. – P. 19–25.
4. Canton R., Morosini M.I. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2011. – 35, N 5. – P. 977–991.
5. Crunkhorn S. Infectious diseases: novel agents fight flu infection // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2013. – 12, N 5:345. – doi:10.1038/nrd4013.
6. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – 104, N 6. – P. 1675–1684.
7. Dubey D., Rath S., Sahu M.C., Rout S., Debata N.K., Padhy R.N., Olajubu F.A. A report on infection dynamics of inducible clindamycin resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from a teaching hospital in India // Asian. Pac. J. Trop. Biomed. – 2013. – 3, N 2. – P. 148–153.
8. Guerreiro-Tanomaru J.M., de Faria-Júnior N.B., Duarte M.A., Ordinola-Zapata R., Graeff M.S., Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates // J. Endod. – 2013. – 39, N 3. – P. 346–350.
9. Hojgard S. Antibiotic resistance. Why is the problem so difficult to solve? // Infect. Ecol. Epidemiol. – 2012. – 2: 10.3402/iee.v2i0.18165.
10. Janek T., Lukaszewicz M., Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5 // BMC Microbiol. – 2012. – 12:24. doi: 10.1186/1471-2180-12-24.
11. Kalyani R., Bishwambhar M., Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // Int. Res. J. Pharm. – 2011. – 2, N 8. – P. 11–15.
12. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era // Cold. Spring. Harb. Perspect. Med. – 2013. – 3, N 4:a010306. – doi: 10.1101/cshperspect.a010306.

13. Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., de Campos-Takaki G.M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995 // *Curr. Microbiol.* – 2011. – **62**, N 5. – P. 1527–1534.
14. Melescanu Imre M., Preoteasa E., Tancu A., Preoteasa C.T. Imaging technique for the complete edentulous patient treated conventionally or with mini implant overdenture // *J. Med. Life.* – 2013. – **16**, N 1. – P. 86–92.
15. Meylheuc T., Methivier C., Renault M., Herry J.M., Pradier C.M., Bellon-Fontaine M.N. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes* // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2006. – **52**, N 2. – P. 128–137.
16. Nitschke M., Araujo L.V., Costa S.G., Pires R.C., Zeraik A.E., Fernandes A.C., Freire D.M., Contiero J. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2009. – **49**, N 2. – P. 241–247.
17. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – **12**, N 1. – P. 633–654.
18. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Campos-Takaki G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2011. – **84**, N 1. – P. 1–5.
19. Sriram M.I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosept R., Srisakthi K., Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2011. – **85**, N 2. – P. 174–181.
20. Taff H.T., Nett J.E., Andes D.R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays // *Med. Mycol.* – 2012. – **50**, N 2. – P. 214–218.
21. Tawakoli P.N., Al-Ahmad A., Hoth-Hannig W., Hannig M., Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm // *Clin. Oral. Investig.* – 2013. – **17**, N 3. – P. 841–850.
22. Udombijitkul P., Alnoman M., Sarker M.R. Inactivation strategy for *Clostridium perfringens* spores adhered to food contact surfaces // *Food Microbiol.* – 2013. – **34**, N 2. – P. 328–336.
23. Willems R.J., Hanage W.P., Bessen D.E., Feil E.J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2011. – **35**, N 5. – P. 872–900.
24. 5. Zeraik A.E., Nitschke M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity // *Curr. Microbiol.* – 2010. – **61**, N 6. – P. 554–559.

Отримано 24.10.2013