

УДК 579.873:543.395:655.637

**АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1**

**АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОШО-АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1**

**ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS*
ЕК-1 SURFASE ACTIVE SUBSTANCES**

Конон А.Д., Морозова А.П., Пирог Т.П.

Конон А.Д., Морозова А.П., Пирог Т.П.

Konon A.D., Morozova A.P., Pirog T.P.

Національний університет харчових технологій, Україна, м. Київ, вул.

Володимирська, 68; +38 063 170 23 17, E-mail: KononA@meta.ua

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, антимікробні властивості, олія чайного дерева.*

Ключевые слова: *поверхностно-активные вещества, антимикробные свойства, масло чайного дерева.*

Key words: *surface active substances, antimicrobial properties, manuka oil.*

*Встановлено, що поверхнево-активним речовинам (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 притаманні антимікробні властивості. Через 2 год обробки досліджуваними препаратами ПАР (0,92–1,44 мг/мл) спостерігається загибель 97 % клітин *Bacillus subtilis* БТ-2, 85 % – *Candida tropicalis* ПБТ-5, 74 % – *Candida albicans* Д-6 і 7 % – *Candida utilis* БВС-65. ПАР посилюють антимікробну дію олії чайного дерева на певні мікроорганізми (*C. albicans* Д-6, *Aspergillus niger* Р-3, *Staphylococcus aureus* БМС-1) завдяки власним як*

антимікробним, так і емульгувальним властивостям. За одночасного внесення у суспензію досліджуваних тест-культур (10^4 – 10^5 клітин/мл) емульсії на основі олії чайного дерева (12,5 мкл/мл) і ПАВ (0,43 мг/мл) кількість живих клітин через 15 хв експозиції була на 0,7–66 % нижчою, ніж у разі обробки суспензії мікроорганізмів препаратами олії без поверхнево-активних речовин.

Установлено, що поверхно-активні речовини (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 мають антимікробні властивості. Через 2 ч обробки досліджуємих препаратів ПАВ (0,92–1,44 мг/мл) спостерігається знищення 97 % клітин *Bacillus subtilis* БТ-2, 85 % – *Candida tropicalis* ПБТ-5, 74 % – *Candida albicans* Д-6 і 7 % – *Candida utilis* БВС-65. ПАВ посилюють антимікробну дію масла чайного дерева на деякі мікроорганізми (*C. albicans* Д-6, *Aspergillus niger* Р-3, *Staphylococcus aureus* БМС-1) завдяки своїм як антимікробним, так і емульгуючим властивостям. При одночасному внесенні в суспензію досліджуваних тест-культур (10^4 – 10^5 клітин/мл) емульсії на основі масла чайного дерева (12,5 мкл/мл) і ПАВ (0,43 мг/мл) кількість живих клітин через 15 мин експозиції була на 0,7–66 % нижче, ніж при обробці суспензії мікроорганізмів препаратами масла без поверхнево-активних речовин.

It was determined that surface active substances (SAS) produced by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 had antimicrobial properties. The quantity of living cells of *Bacillus subtilis* BT-2, *Candida tropicalis* PBT-5, *Candida albicans* D-6 and *Candida utilis* BVS-65 decreased on 97 %, 85 %, 74 %, 7 % respectively. It was also determined that SAS amplify the antimicrobial action of manuka oil towards some microorganisms (*C. albicans* D-6, *Aspergillus niger* R-3, *Staphylococcus aureus* BMS-1). It was caused by own as antimicrobial and emulsifying properties of SAS. When emulsion of manuka oil (12.5 mkl/ml) and SAS (0.43 mg/ml) was added into cell suspension (10^4 - 10^5 cells/ml) it was shown that quantity of living cells after 15 min exposition was 0,7-66% lesser then after addition of pure manuka oil.

Останнім часом спостерігається посилення резистентності багатьох патогенних мікроорганізмів до існуючих лікарських засобів, що зумовило пошук альтернативних препаратів. Такими потенційними для використання у медицині можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), оскільки вони нетоксичні, не спричиняють алергії, проявляють антимікробну дію щодо широкого спектру мікроорганізмів [Das et al., 2008; Rodrigues et al., 2006] та характеризуються емульгувальними властивостями [Kumar et al., 2007], завдяки чому ці препарати можуть підвищувати ефективність впливу ефірної олії на патогенні мікроорганізми.

Мета даної роботи – дослідження антимікробних властивостей поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, а також їх здатності посилювати антимікробну дію ефірної олії чайного дерева. Штам *R. erythropolis* ЕК-1 ізолювано із забруднених нафтою зразків ґрунту [Пирог с соавт., 2004] і депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером Ас-5017.

Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 1,3; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001%; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу з 1 % етанолу. Кількість інокуляту – 5% від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °С упродовж 120 год.

Як препарати поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 використовували стерильний супернатант культуральної рідини. Для одержання супернатанту постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 45 хв (5000 g) для осадження біомаси, надосадову рідину зливали і піддавали автоклавуванню при 112 °С (30 хв). Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Вміст ПАР у супернатанті визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча (хлороформ – метанол – 4М НСІ, 4:3:2) [Тарасенко, 2008]. Одержаний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові ІР–1М2 (Росія) при температурі 55 °С та абсолютному тиску 0,4 атм.

У роботі використовували ефірну олію чайного дерева виробництва ТОВ «Ароматика». Приготування препаратів ефірної олії чайного дерева здійснювали відповідно до рекомендацій, викладених в інструкції з її використання. Як емульгатори використовували розчин харчової соди (як вказано в інструкції з використання олії чайного дерева), а також препарати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

У дослідженнях вивчали антимікробну дію таких препаратів, виготовлених на основі ефірної олії чайного дерева і емульгатора:

1) *препарат 1* (0,25 мл олії чайного дерева + 4 мл розчину ПАР). Суміш витримували 1 год на качалці (320 об/хв) для одержання емульсії;

2) *препарат 2* (0,25 мл олії чайного дерева + 4 мл розчину харчової соди). Спосіб приготування аналогічний препарату 1. Концентрація стерильного розчину гідрокарбонату натрію аналогічна концентрації розчину ПАР;

3) *препарат 3* (0,25 мл олії чайного дерева + 4 мл дистильованої води). Цей контрольний препарат використовували для оцінки антимікробної дії олії;

4) *препарат 4* (0,25 мл дистильованої води + 4 мл розчину ПАР). Використання такого контрольного препарату дає змогу оцінити антимікробні властивості препаратів ПАР.

Для визначення антимікробних властивостей ПАР і препаратів 1–4 використовували такі тест-культури: *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida utilis* БВС-65, *Candida pseudotropicalis* П-1, *Candida guilliermondii* МБ-4, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3, *Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7. Чисті культури бактерій, грибів і дріжджів зберігаються у музеї живих культур

мікроорганізмів кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Визначення антимікробних властивостей ПАР і препаратів 1–4 здійснювали у рідкому середовищі (суспензійна культура). У вихідній суспензії досліджуваних добових тест-культур, вирощених на агаризованих середовищах, визначали кількість живих клітин за методом Коха (колоній-утворювальні одиниці, КУО/мл). Потім суспензію тест-культур вносили у пробірки (3 мл), додавали по 1,5–3 мл препарату ПАР (або по 640 мкл препаратів 1–4) і витримували упродовж 1 і 2 год (0; 15 хв) при температурі, оптимальній для росту тест-культур. Після експозиції визначали за методом Коха кількість живих клітин (з врахуванням змінення об'єму суспензії в результаті внесення супернатанту). Виживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у зразках, підданих дії препаратів, до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Для визначення антимікробних властивостей використовували розчини препаратів ПАР з концентрацією 1,84–4,2 мг/мл.

Прояв антимікробних властивостей різних сполук залежить від ряду факторів: концентрації клітин, концентрації досліджуваної речовини і тривалості експозиції. Наші експерименти показали, що кількість живих клітин *C. tropicalis* ПБТ-5 за присутності ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 знижувалася із підвищенням концентрації ПАР і збільшенням тривалості обробки (табл. 1). Так, найсуттєвіше зниження кількості дріжджових клітин спостерігалось за обробки суспензії препаратами ПАР у найвищій досліджуваній концентрації (1,44 мг/мл) упродовж 2 год (табл. 1). За таких умов кількість живих клітин *C. tropicalis* ПБТ-5 знижувалася на 80 %. На прикладі *C. albicans* Д-6 було показано, що не завжди максимальні концентрації є найефективнішими. Так, при внесенні 0,92 мг/мл ПАР вживання клітин становило 26–33 %, а із збільшенням концентрації до 1,44 мг/мл збільшувалося до 44–47 % (табл. 1). Незначне зниження кількості клітин *C. utilis* БВС-65 (на 5–7 %) також спостерігалось за нижчої концентрації ПАР (1,4 мг/мл). Одержані результати

можна пояснити взаємодією ПАР та клітин на молекулярному рівні та згадати принципи гомеопатії, за якими більш розбавлені розчини є активнішими.

Таблиця 1

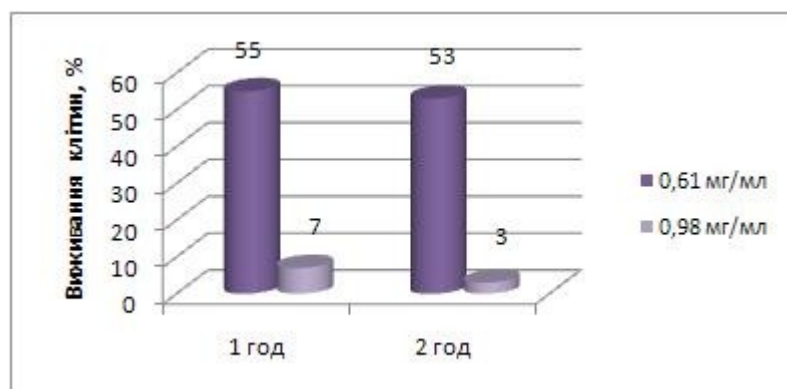
Вплив концентрації ПАР та тривалості експозиції на кількість клітин *C. tropicalis* ПБТ-5 і *C. albicans* Д-6

Концентрація ПАР, мг/мл	<i>C. tropicalis</i> ПБТ-5		<i>C. albicans</i> Д-6	
	Логарифм кількості живих клітин через			
	1 год	2 год	1 год	2 год
0,61	8,2±0,41	6,4±0,32	5,6±0,28	5,45±0,29
0,92	6,3±0,32	6,1±0,30	5,4±0,27	5,3±0,25
1,44	5,9±0,27	5,8±0,29	5,5±0,26	5,5±0,26

Примітка. Логарифм кількості клітин у вихідній суспензії становив: *C. tropicalis* ПБТ-5 – 6,5±0,32; *C. albicans* Д-6 – 5,85±0,29.

Зазначимо, що через 1 год після обробки суспензії клітин *C. tropicalis* ПБТ-5 препаратами ПАР (1,6 мг/мл) спостерігали збільшення кількості живих клітин (навіть на порядки) з подальшим різким зниженням на кінець 2-ої год експозиції (табл. 1). Аналогічна ситуація спостерігалася при дослідженні дії ПАР на суспензію клітин *C. guilliermondii* МБ-4, тільки стимуляція росту клітин була відзначена для всіх концентрацій ПАР та не знижувалась після двогодинної експозиції. Ми вважаємо, що це явище може бути зумовлене кількома причинами: інерційним розмноженням культури (оскільки використовували клітини з експоненційної фази росту), наявністю у супернатанті додаткових поживних речовин, реакцією клітин на стресову дію, а також певною взаємодією ПАР і клітин на молекулярному рівні.

На *рисунку* наведено залежність виживання клітин *B. subtilis* БТ-2 від концентрації ПАР та тривалості обробки. З наведених даних видно, що за присутності ПАР у концентрації 0,98 мг/мл спостерігається загибель більш як 90 % клітин *B. subtilis* БТ-2 уже через годину експозиції. За нижчої концентрації ПАР (0,61 мг/мл) виживання клітин становило 53–55 % незалежно від тривалості обробки.



Вплив концентрації ПАР на виживання *B. subtilis* БТ-2.
Початкова концентрація клітин $3,0 \cdot 10^6$ КУО/мл.

Наступні експерименти показали, що препарати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 не проявляли антимікробної дії по відношенню до бактерій *E. coli* ІЕМ-1, дріжджів *S. cerevisiae* ОБ-3 та *C. pseudotropicalis* П-1 і мікроміцетів (*A. niger* Р-3 і *F. culmorum* Т-7). Ймовірно, що для пригнічення росту цих мікроорганізмів необхідна вища концентрація ПАР або більша тривалість обробки.

У дослідженнях з ефірною олією чайного дерева також не було виявлено антимікробної дії препарату 4 (препарат ПАР): виживання *A. niger* Р-3 становило 100 % й через 15 хв експозиції (табл. 2). Разом з тим, за присутності ПАР спостерігали посилення антимікробної дії на клітини мікроміцетів ефірної олії (препарат 1). За використання такого препарату виживання клітин через 15 хв після обробки було найнижчим і становило 20–21 % (табл. 2). Очевидно, у цьому разі підвищення ефективності препарату 1 зумовлене емульгувальними властивостями ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

Іншою цікавою особливістю дії досліджуваних препаратів на клітини *A. niger* Р-3 було те, що за використання препаратів 2 і 3 спостерігали збільшення кількості живих клітин (на 5 і 62 % відповідно) через 15 хв експозиції. Ці результати свідчать про фунгістатичну (проте не фунгіцидну) дію олії чайного дерева. Фунгіцидну ж дію препарату 1, який містить і олію, і ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 можна пояснити вищими емульгувальними властивостями поверхнево-активних речовин порівняно з такими гідрокарбонату натрію, що

забезпечує сильнішу взаємодію компонентів препарату з клітинами, а отже, й тривалішу антимікробну дію.

Таблиця 2

Виживання клітин *A. niger* Р-3, оброблених препаратами ефірної олії чайного дерева і поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1

Препарати на основі	Виживання клітин (%) за тривалості експозиції (хв)	
	0	15
Олії і ПАР (препарат 1)	50,0±0,5	21,3±0,1
Олії і соди (препарат 2)	34,3±0,7	40,0±0,4
Олії і води (препарат 3)	25,0±0,4	87,5±0,5
ПАР і води (препарат 4)	100,0±0,5	100,0±0,5

Примітка. Початкова концентрація клітин *A. niger* Р-3 (до внесення препаратів) становила $3 \cdot 10^4$ КУО/мл.

Посилення антимікробної дії олії чайного дерева за присутності поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 в результаті їхніх як антимікробних, так і емульгувальних властивостей спостерігалось і для бактерій *S. aureus* БМС-1 (зниження живих клітин на 5–7 %), і для дріжджів *C. albicans* Д-6 (0,4–0,7 %).

Отже, поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ЕК-1 в досить низьких концентраціях (0,95–1,5 мг/мл) є ефективнішими, ніж ПАР *Lactococcus lactis* 53 і *Streptococcus thermophilus* А [Rodrigues et al., 2004], але менш ефективними, ніж ПАР *Pseudozyma fusiformata* [Kulakovskaya et al., 2005] і *Bacillus circulans* [Das et al., 2008]. Таке явище можна пояснити використанням неочищених препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено, що поверхнево-активні речовини, синтезовані *R. erythropolis* ЕК-1, проявляють антимікробну дію щодо ряду мікроорганізмів (*C. tropicalis* ПБТ-5, *C. utilis* БВС-65, *B. subtilis* БТ-2 та *C. albicans* Д-6) і посилюють антимікробну дію ефірної олії чайного дерева на клітини *S. aureus* БМС-1, *A. niger* Р-3 і *C. albicans* Д-6.

Ми припускаємо, що прояв антимікробної дії препаратів ПАР може залежати від фізіологічного стану тест-культур, особливостей будови і

хімічного складу клітинних оболонок і різних адаптаційних реакцій цих мікроорганізмів на стресові дії. Виясненню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Список літератури

1. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 544–550.
2. Тарасенко Д.О. Модифікація методу кількісного визначення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. – Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 40–43.
3. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 104, № 6. – P. 1675–1684.
4. Kulakovskaya T.V., Shashkov A.S., Kulakovskaya E.V., Golubev W.I. Ustilagic acid secretion by *Pseudozyma fusiformata* strains // FEMS Yeast Research. – 2005. – V. 5. – P. 919–923.
5. Kumar A.S., Mody K., Jha B. Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium // Bull. Environ. Contam. Toxicol. – 2007. – V. 79. – P. 617–621.
6. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57. – P. 609–618.
7. Rodrigues L.R., Van der Mei H.C., Teixeira J., Oliveira R. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 4408–4410.