

УДК 579.22

А.Б. Скочко, магістрант,
А.Д. Конон, асп.,
Т.П. Пирог, д-р біол. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER* *CALCOACETICUS* IMB B-7241

Встановлено, що препарати поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 (0,093—0,22 мг/мл) у вигляді супернатанту культуральної рідини проявляють антимікробну дію щодо деяких мікроорганізмів-представників прокариот (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Xanthomonas vesicatoria* 7790) та еукариот (деяких дріжджів роду *Candida* та *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Не спостерігалось інгібуючого впливу ПАР на фітопатогенний штам *Pseudomonas savantanoi* pv. *lycinea* 8571 та антифунгальної їх дії щодо *Aspergillus niger* Р-3 і *Fusarium culmorum* Т-7. Виявлено, що дія препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 залежала від фізіологічного стану *B. subtilis* БТ-2, при цьому спорова культура була менш стійкою, ніж вегетативні клітини.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхнево-активні речовини, антимікробна дія

Поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження є перспективними для використання у боротьбі з інфекційними захворюваннями, завдяки тому, що вони здатні проявляти антибактеріальну, антивірусну та антифунгальну активність [3, 4]. Підвищений інтерес дослідників до ПАР мікробного походження зумовлений їх антимікробною дією щодо мікроорганізмів, стійких до традиційних лікарських препаратів, що значно ускладнює процес лікування інфекцій [2, 5].

Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [1]. Вперше було встановлено здатність цього штаму синтезувати низькомолекулярні сполуки з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на етанолі. За хімічною природою ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 є комплексом гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів, причому гліколіпіди представлені трегалозоміколатами.

Мета даної роботи — дослідження антимікробних властивостей поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241, у тому числі і щодо фітопатогенних бактерій.

Основним об'єктом дослідження був штам *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241; а також штами *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Pseudomonas savantanoi* pv. *lycinea* 8571, *Xanthomonas vesicatoria* 7790, *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida utilis* БВС-65, *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. Штами *P. savantanoi* pv. *lycinea* 8571 та *X. vesicatoria* 7790 були люб'язно надані співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NaCl — 1,0, Na_2HPO_4 — 0,6, KH_2PO_4 — 0,14, рН 6,8—7,0. Як джерело вуглецю використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Посівним мате-

© А.Б. Скочко, А.Д. Конон, Т.П. Пирог, 2012

ріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з кінця експоненційної фази росту (48 год), вирощена на середовищі наведеного вище складу. Посівний матеріал вносили у концентрації 10 % від загального об'єму. Культивування проводили на качалках (320 об/хв, $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) впродовж 120 год.

Як препарати поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 використовували стерильний супернатант культуральної рідини. Для одержання супернатанту постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 15 хв (5000 g) для осадження біомаси, надосадову рідину зливали і піддавали автоклавуванню при $112\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 хв). Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у супернатантах (препаратах ПАР) використовували показник умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначали як ступінь розбавлення супернатанту культуральної рідини (препарату ПАР) у точці збільшення поверхневого натягу на графіку залежності γ_a від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається в умовних одиницях.

Визначення концентрації ПАР у препаратах (г/л) здійснювали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів сумішшю Фолча. Для цього 25 мл супернатанту поміщали в циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додавали 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1, суміш Фолча) і струшували (з метою екстракції ліпідів) протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 16 мл суміші Фолча і проводили екстракцію ліпідів протягом 5 хв. Після розділення фаз, збирали нижню фракцію і отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 змішували і упарювали на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ і абсолютному тиску 0,4—0,5 атм до постійної маси.

Визначення антимікробних властивостей препаратів ПАР у суспензійній культурі здійснювали так. У вихідній суспензії досліджуваних добових тест-культур, вирощених на агаризованих середовищах (бактерії на МПА при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, гриби при $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 дріжджів при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ на ГКА), 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 і витримували упродовж 1 і 2 год при температурі, оптимальній для росту тест-культур. Після експозиції визначали за методом Коха кількість живих клітин (з врахуванням зміння об'єму суспензії в результаті внесення супернатанту).

В одному з варіантів досліджували антимікробну дію препаратів ПАР на вегетативні (15 год росту) і спорові (72 год росту) клітини *B. subtilis* БТ-2.

Вживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у оброблених препаратами ПАР зразках до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Відомо, що антимікробна дія ПАР залежить від багатьох факторів: складу поживного середовища для вирощування продуцента, концентрації ПАР у зразку, ступеня його очищення і тривалості експозиції, особливостей будови клітинної мембрани тест-штамів та можливої присутності у культуральній рідині неідентифікованих антибіотичних речовин [6].

На першому етапі досліджень ми аналізували вплив препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на добові культури *B. subtilis* БТ-2 (грампозитивні бактерії, які можуть утворювати термостійкі спори і бути шкідниками виробництва), *X. vesicatoria* 7790 (фітопатогенний штам, збудник чорної плямистої хвороби помідорів), *S. cerevisiae* ОБ-3 (найпоширеніший у виробництві штам дріжджів) (табл. 1).

Таблиця 1. Вживання деяких бактерій і дріжджів під дією препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Тест-культура	Об'єм препарату ПАР, мл	Концентрація ПАР у препараті, мг/мл	Вживання клітин, (%), через	
			1 год	2 год
<i>B. subtilis</i> БТ-2	1,5	0,15	1,4±0,07	0,52±0,03
	3	0,22	0	0
<i>X. vesicatoria</i> 7790	1,5	0,093	2,3±0,12	1,3±0,07
	3	0,14	4,4±0,22	1,6±0,08
<i>S. cerevisiae</i> ОБ-3	1,5	НВ	62,8±3,14	54,9±2,74
	3	НВ	76,3±3,81	52,1±2,60

Примітка. Кількість клітин *B. subtilis* БТ-2 (добова культура) до внесення препаратів ПАР становила 4-106 КУО/мл, *X. vesicatoria* 7790 — 8,58 -106 КУО/мл, *S. cerevisiae* ОБ-3 — 5,02 '106 КУО/мл. «НВ» — не визначали, умовна концентрація ПАР у препараті становила 2,5.

Тут і у табл. 2: як препарати ПАР використовували стерильні супернатанти культуральної рідини, кількість клітин у контрольних (не оброблених препаратами ПАР) варіантах не змінювалася упродовж 2 год експозиції.

Дані, наведені у табл. 1, засвідчують яскраво виражену антимікробну дію препаратів ПАР (0,093—0,14 мг/мл) щодо фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas*, причому кількість живих клітин знижувалася більше ніж на 95 %, а дія препаратів ПАР залежала значною мірою від часу, а не від концентрації. Для *B. subtilis* БТ-2 характерною була повна загибель клітин при внесенні препарату з концентрацією ПАР 0,22 мг/мл. Кількість клітин *S. cerevisiae* ОБ-3 зменшувалася на 24,7—37,2 % після 1 год обробки досліджуваними препаратами ПАР у кількості 1,5 і 3 мл. Після двох годин експозиції кількість клітин *S. cerevisiae* ОБ-3 знижувалася майже вдвічі, що свідчило про те, що антимікробна дія препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо *S. cerevisiae* ОБ-3 більшою мірою залежала від тривалості обробки препаратами ПАР, ніж від їх концентрації.

Наступні результати показали, що за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 спостерігалася стимуляція розвитку деяких тест-культур, як про- так і еукаріотних. Як тест-культури у цих дослідженнях використовували штами *E. coli* ІЕМ-1 (грам-негативні бактерії, які можуть спричиняти колі-інфекції), *Pseudomonas savantanoi* рв. *lycinea* 8571 (фітопатогенна бактерія, яка спричиняє плямисті ураження пасльонових рослин), а також представників умовно патогенних дріжджів роду *Candida*, які здатні спричиняти кандидоз — *C. tropicalis* ПБТ-5, *C. albicans* Д-6, *C. utilis* БВС-65 (табл. 2).

Таблиця 2. Стимуляція росту деяких тест-культур за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Тест-культура	Концентрація ПАР у препараті, мг/мл	Логарифм початкової кількості клітин	Логарифм кількості живих клітин через	
			1 год	2 год
<i>E. coli</i> ІЕМ-1	0,22	4,6±0,23	5,1±0,25	5,2±0,24
<i>P. savantanoi</i> рв. <i>lycinea</i> 8571	0,093	4,5±0,22	4,6±0,23	4,7±0,24
	0,14	4,4±0,21	4,8±0,24	4,7±0,24
<i>C. albicans</i> Д-6	0,15	5,6±0,28	6,0±0,30	5,4±0,27
	0,22	5,4±0,27	5,7±0,28	5,3±0,26
<i>C. tropicalis</i> ПБТ-5	0,22	5,1±0,25	4,7±0,24	5,1±0,25
<i>C. utilis</i> БВС-65	0,15	5,7±0,28	5,8±0,29	5,3±0,26

Дані експериментів показали, що за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 кількість клітин *C. albicans* Д-6 збільшувалася через годину, проте через 2 години спостерігали їх зниження. Аналогічну дію спричиняв препарат ПАР (0,22 мг/мл) на штам *C. utilis* БВС-65. Для штамів *E. coli* ІЕМ-1 та *C. tropicalis* ПБТ-5 загальною

закономірністю було збільшення кількості клітин у разі застосування препаратів з максимальною концентрацією ПАР (0,22 мг/мл) і обробки протягом 2 год. Кількість живих клітин фітопатогенного штаму *P. savantanoi* pv. *lysinea* 8571 збільшувалася незалежно від концентрації препаратів і тривалості обробки. Таке явище може пояснюватися наявністю в супернатанті поживних речовин, до споживання яких здатні ці штами, а також адаптивними реакціями клітин тест-культури на стресові дії. Подібні ефекти були і раніше описані в літературних джерелах [5]. Слід зазначити, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у концентрації 0,15 мг/мл не спричиняли стимулюючої дії на штами *E. coli* IEM-1 та *C. tropicalis* ПБТ-5, а 0,22 мг/мл — щодо *C. utilis* BVC-65.

Наступним етапом досліджень була перевірка залежності антимікробної дії ПАР від фізіологічного стану культури. Для цього ми обрали *B. subtilis* БТ-2, оскільки цей штам здатний до спороутворення. Як видно із наведених у табл. 3 даних, що 15-годинна (вегетативна) культура *B. subtilis* БТ-2 виявилася загалом більш стійкою до дії ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241, ніж спорова культура (табл. 3).

Зазначимо, що для вегетативної культури характерним було зниження кількості клітин із збільшенням концентрації препаратів ПАР і тривалості обробки, у той час як виживання спорової культури значно більше залежало від концентрації, ніж від часу (табл. 3). Такі відмінності пояснюються різними механізмами взаємодії ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із клітинними структурами вегетативних клітин і спор *B. subtilis* БТ-2.

Таблиця 3. Антимікробна дія препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на вегетативні і спорові клітини *B. subtilis* БТ-2

Фізіологічний стан клітин	Об'єм препарату ПАР, мл	Вживання клітин (%) через	
		1 год	2 год
Вегетативні (15 год росту)	1,5	90,8±4,5	63,7±3,1
	3,0	78,5±3,9	52,9±2,6
Спорові (72 год росту)	1,5	26,6±1,3	24,9±1,2
	3,0	49,0±2,4	43,7±2,0
Примітка. Умовна концентрація ПАР — 2,5. Кількість клітин <i>B. subtilis</i> БТ-2 до внесення препаратів ПАР становила (КУО/мл): 15 год — 4,5106; 72 год — 6,3106.			

Той факт, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 краще інгібували спорову культуру, дає можливість використовувати їх у боротьбі із резистентними контамінантами, здатними до спороутворення.

Наступні експерименти показали, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* MB B-7241 у концентрації 0,15 і 0,22 мг/мл не проявляють антимікробної дії щодо 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.

Ми припускаємо також, що прояв антимікробної дії препаратів ПАР може залежати від особливостей будови і хімічного складу клітинних оболонок і різних адаптаційних реакцій цих мікроорганізмів на стресові дії. Пошуку нових даних у цьому напрямку будуть присвячені наші подальші дослідження.

Висновки. Показано, що максимальна антимікробна активність препаратів ПАР *A. calcoaceticus* MB B-7241 спостерігалася щодо бактеріальних тест-культур: виживання *X. vesicatoria* 7790 за присутності препарату ПАР (0,093 мл/мл) через 2 год становило близько 1,3 %; за концентрації ПАР 0,22 мг/мл спостерігали повну загибель *B. subtilis* БТ-2. Кількість клітин дріжджів *C. albicans* Д-6, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* ОБ-3 знижувалась на 30—50 % після обробки препаратами ПАР упродовж 2 год. Для *P. savantanoi* pv. *lysinea* 8571 характерним було збільшення кількості клітин незалежно від концентрації препаратів ПАР. Встановлено залежність антимікробної дії препаратів

ПАР від фізіологічного стану тест-культури *B. subtilis* БТ-2 — виживання вегетативних клітин за присутності препаратів ПАР знижувалося до 63,7 %, а спорових — до 24,9 %.

ЛІТЕРАТУРА

1. Конон А.Д., Морозова А.П., Пирог Т.П., Скочко А.Б. Антимикробные свойства биосурфактантов *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // VII межд. конф. «Современное состояние микробиологии и биотехнологии» (31 мая — 4 июня 2010 г, г. Минск, Беларусь). — С. 357—359.
2. Arutchelvi J.I., Bhaduri S., Uppara P.V., Doble M. Mannosylerythritol lipids: a review // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V.35. — P. 1559—1570.
3. Banat I.M., Makkar R., Cameotra S. Potential commercial applications of microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000. — V. 53. — P. 495—508.
4. Mohammadpour M., Mousivand M., Abbasalizadeh S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides* // Can. J. Microbiol. — 2009. — V. 55. — P. 395—404.
5. Kim K., Yoo D., Kim Y. and et. Characteristics of sophorolipid as an antimicrobial agent // J. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 12, №2. — P. 235—241.

А.Б. Скочко, А.Д. Конон, Т.П. Пирог

Исследование антимикробного действия поверхностно-активных веществ

Acinetobacter calcoaceticus ИМВ В-7241

Установлено, что препараты поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 (0,093—0,22 мг/мл) в виде супернатанта культуральной жидкости проявляли антимикробное действие по отношению к некоторым микроорганизмам-представителям прокариот (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Xanthomonas vesicatoria* 7790) и эукариот (некоторые дрожжи рода *Candida* и *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Не наблюдали ингибирующего влияния ПАВ на фитопатогенный штамм *Pseudomonas savatanoi* pv. *lycinea* 8571 и антифунгального их действия по отношению к *Aspergillus niger* Р-3 и *Fusarium culmorum* Т-7. Показано, что действие препаратов ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 зависело от физиологического состояния *B. subtilis* БТ-2, при этом споровая культура была менее устойчивой, чем вегетативные клетки.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, поверхностно-активные вещества, антимикробное действие.

A. Skochko, A. Konon, T. Pirog

Investigation of antimicrobial action of surface-active substances

Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241

It was established that preparations of surface-active substances of strain *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 (0,093—0,22 mg/ml) as culture liquid supernatant showed antimicrobial activity against certain microorganisms, prokaryotic representatives (*Bacillus subtilis* BT-2, *Escherichia coli* IEM-1, *Xanthomonas vesicatoria* 7790) and eukaryotic (*Candida* and *Saccharomyces cerevisiae* OB-3). There was no inhibitory effect on phytopathogenic strain *Pseudomonas savatanoi* pv. *lycinea* 8571 and fungi *Aspergillus niger* R-3 and *Fusarium culmorum* T-7. The effect of *A. calcoaceticus* IMV B-7241 surfactant depended on physiological state of *B. subtilis* BT-2: vegetative cells were more resistant as compared to the spores.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, surface active substances, antimicrobial action.

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 21.12.2011 р.