

УДК 759.873.088.5:661.185

А. Б. Скочко, магістрант

А.Д. Конон, аспірант

Т.П. Пирог, доктор біол. наук

Національний університет харчових технологій

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИАДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Препарати поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 (0,28 мг/мл) зменшували кількість прикріплених клітин Bacillus subtilis БТ-2 різного фізіологічного стану на кафелі на 38,7–45,8 % і лінолеумі на 79,1–85,8 %, Escherichia coli IEM-1 – на сталі, пластику і кафелі на 41, 15 і 14 % відповідно. Такі препарати можуть бути використані як антиадгезивні компоненти дезінфікуючих засобів.

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

З літературних джерел відомо, що бактерії здатні адгезуватися на поверхні різних матеріалів і формувати біоплівку, небезпека утворення якої полягає у тому, що прикріплені мікробні клітини набувають резистентності до антимікробних препаратів [3, 4]. Одним із способів очищення та дезінфекції поверхонь є використання поверхнево-активних речовин (ПАР) мікробного походження як антиадгезивних

агентів, здатних запобігати формуванню біоплівки або стимулювати руйнування уже наявної структури [3, 4]. Так, встановлено здатність сурфактину знижувати рівень прикріплених клітин деяких патогенних мікроорганізмів, які можуть спричиняти харчові отруєння. Після обробки сурфактином нержавіючої сталі та полімерних матеріалів, використовуваних у харчовій промисловості, штами *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* та *Enterobacter sakazakii* значно гірше адгезуватися на ці матеріали [3].

Оскільки взаємодія бактерій із твердими поверхнями залежить від гідрофільності (гідрофобності) клітини і матеріалу за правилом «подібне розчиняється у подібному», механізм антиадгезивної дії ПАР мікробного походження полягає у модифікації поверхні матеріалу і зміни її гідрофільності (гідрофобності), внаслідок чого мікроорганізми втрачають здатність адгезуватися на такій поверхні [3].

Зниження рівня адгезії та зменшення клітин у популяції біоплівки може бути використане для дезінфекції обладнання харчової промисловості, а також у клінічній практиці для усунення бактеріальної колонізації поверхонь медичних приладів.

Мета даної роботи – дослідження антиадгезивних властивостей препаратів ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241.

Основним об'єктом дослідження був штам *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, виділений із забруднених нафтою зразків ґрунту та депонований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології за номером IMB B-7241; а також штами *Escherichia coli* IEM-1 і *Bacillus subtilis* БТ-2. Чисті культури бактерій зберігаються у музеї живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 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). У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка). Посівним матеріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* IMB B-7241 з кінця експоненційної фази росту (48 год), вирощена на середовищі наведеного вище складу. Для отримання посівного матеріалу використовувалися добові культури *A. calcoaceticus* IMB B-7241, вирощені на м'ясо-пептонному агарі при температурі 30 °С. Посівний матеріал вносили у концентрації 10 % від загального об'єму. Культивування проводили на качалках (320 об/хв, $t=30$ °С) 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 °С (30 хв).

Для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у супернатанті (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 σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*. Умовна концентрація ПАР виражається в умовних одиницях.

Кількість ПАР в культуральній рідині (г/л) визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних речовин 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 °С і абсолютному тиску 0,4–0,5 атм до постійної маси.

Визначення антиадгезивних властивостей препаратів ПАР проводили так. Однакові пластинки досліджуваного матеріалу (лінолеум, кафель, пластик, нержавіюча сталь) розміром 1 см² очищали за допомогою миючого засобу «Gala», ополіскували у дистильованій воді і стерилізували відповідно до матеріалу (кафель, нержавіюча сталь – при 112 °С, 1 год; пластик, лінолеум – 112 °С, 30 хв).

Частину пластинок матеріалу обробляли препаратами ПАР, а іншу – стерильною дистильованою водою (контроль), для чого поміщали пластинки на 24 год у препарат (або дистильовану воду) і витримували при кімнатній температурі, щоб відбулася взаємодія ПАР із поверхнею матеріалу. Потім контрольні і попередньо оброблені препаратами ПАР пластинки ополіскували 10 мл стерильної дистильованої води для видалення залишку препаратів.

Для забезпечення прикріплення клітин на поверхню матеріалів у суспензію тест-культур поміщали попередньо оброблені препаратами ПАР і контрольні пластинки матеріалу і витримували 2 год при кімнатній

температурі, потім ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води для видалення неадгезованих клітини. Пластинки поміщали у колбу із 20 мл стерильної водопровідної води і кульками бісеру та струшували 5 хв, щоб змити адгезовані клітини. Кількість клітин у суспензії визначали за методом Коха.

Кількість адгезованих клітин визначали як відношення кількості адгезованих клітин на попередньо оброблених препаратами ПАР зразках до кількості клітин на контрольних зразках і виражали у відсотках.

З літератури [3] відомо, що обробка сталі і поліпропілену сурфактином спричиняла зниження числа адгезованих клітин *E. sakazakii* і *L. monocytogenes* на обох поверхнях. Найефективніше сурфактин діяв щодо *L. monocytogenes*, коли логарифм кількості клітин знизився із 7,9 до 5,7 – тобто на 10^2 КУО/см². Адгезія *Salmonella enteritidis* на нержавіючій сталі після обробки сурфактином майже не зменшувалась, тоді як на поліпропілені цей показник адгезії усіх штамів значно знижувався. Лише для *S. enteritidis* показано незначне збільшення кількості прикріплених клітин. Після обробки обох видів поверхонь рамноліпідами не було відмічено помітного зниження кількості прикріплених клітин будь-якого штаму [3].

На першому етапі наші дослідження були спрямовані на виявлення антиадгезивних властивостей ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 щодо добових культур *B. subtilis* БТ-2 та *E. coli* IEM-1 (табл. 1)

Таблиця 1

Вплив препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на адгезію клітин бактерій на деякі матеріали

Тест-культура	Адгезія клітин (%), на			
	лінолеум	сталь	пластик	кафель
<i>B. subtilis</i> БТ-2	17,6±0,9	–	*	58,7±2,9

<i>E. coli</i> IEM-1	*	59±2,9	85±4,2	86±4,3
----------------------	---	--------	--------	--------

Примітка. Тут і у табл. 2: концентрація ПАР у препараті – 0,28 мг/мл. «–» – не спостерігалось адгезії на даний матеріал; «*» – виявлено стимуляцію адгезії на даний матеріал. Кількість клітин у контрольному зразку приймали за 100 %.

Як видно із даних, наведених у табл. 1, досліджувані препарати ПАР спричиняли зниження кількості прикріплених клітин *B. subtilis* БТ-2 на лінолеумі та кафелі на 82,4 % і 41,3 % відповідно. Водночас спостерігалось збільшення чисельності прикріплених клітин *B. subtilis* БТ-2 на пластикову поверхню і не відбувалося адгезії на нержавіючу сталь.

Для штаму *E. coli* IEM-1 характерним було зниження адгезії на сталеві пластинки на 41 %, на пластик – на 15 % і на кафель – на 14 % під впливом препаратів ПАР, проте спостерігалось зростання кількості прикріплених клітин *E. coli* IEM-1 на лінолеум.

Процеси прикріплення обох досліджуваних бактерій до різних поверхонь суттєво відрізнялися між собою. Наприклад, грамнегативні клітини *E. coli* IEM-1 адгезувалися на сталь, на яку грампозитивні клітини *B. subtilis* БТ-2 не прикріплювалася. Кількість адгезованих на пластикових пластинках клітин *E. coli* IEM-1 зменшувалася на 15 %, а прикріплення *B. subtilis* БТ-2 навпаки, стимулювалося за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

Відмінності у процесах адгезії грампозитивних і грамнегативних тест-культур на різні матеріали, оброблені препаратами ПАР, можуть бути зумовлені різним хімічним складом поверхневих структур клітинних стінок цих бактерій.

Раніше нами було встановлено, що прояв антимікробної дії препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 залежав від фізіологічного стану тест-культури *B. subtilis* БТ-2 [1, 2].

На наступному етапі ми досліджували антиадгезивну активність ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 щодо вегетативної та спорової культури *B. subtilis* БТ-2 (табл. 2)

Таблиця 2

Залежність кількості прикріплених до деяких матеріалів клітин *B. subtilis* БТ-2 від фізіологічного стану культури за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Вік тест-культури, год	Адгезія клітин (%), на			
	лінолеум	сталь	пластик	кафель
15	20,8±1,0	–	*	61,3±3,1
72	14,2±0,7	–	*	54,2±2,7

Результати, наведені у табл. 2, свідчать про те, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у концентрації 0,28 мг/мл спричиняли зниження числа прикріплених клітин *B. subtilis* БТ-2 різного фізіологічного стану, на лінолеумі та кафелі, причому показники прикріплення знижувалися зі зростанням віку клітин, тобто 72-х година культура адгезувалася гірше, ніж 15-ти годинна (14,2 % на лінолеумі, 54,2 % на кафелі).

Аналогічно, як і для добової культури *B. subtilis* БТ-2 (табл. 1), для спор характерним було збільшення адгезії клітин на пластикову поверхню і не відбувалося прикріплення на пластинки сталі. Таке явище для клітин різного фізіологічного стану може пояснюватися реакціями

клітин на стресові дії, а також особливостями взаємодії матеріалів із поверхневими структурами клітин.

Ми припускаємо також, що адгезія культури залежить від природи її поверхневих структур і властивостей матеріалу-мішені та фізико-хімічних властивостей ПАР, які входять до складу препаратів. Вирішенню цих питань будуть присвячені наші подальші дослідження.

Висновки. Встановлено, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 знижували кількість прикріплених клітин *B. subtilis* БТ-2 різного фізіологічного стану на лінолеум на 79,1–85,8 % і кафель на 38,7–45,8 %; водночас спостерігалось стимулювання адгезії на пластик, а на сталеві пластинки клітини не прикріплювалися. Для *E. coli* IEM-1 характерним було зниження кількості адезованних клітин на сталі, пластику і кафелі на 41 %, 15 % і 14 % відповідно, проте спостерігалась зростання прикріплення клітин тест-культури на лінолеум. Отримані результати свідчать про перспективність використання ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 як антиадгезивних компонентів дезінфікуючих засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.Б. Скочко // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 2. – С.24–38.
2. Пирог Т.П. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 та *Rhodococcus erythropolis* EK-1 / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.П. Софілканич, А.Б. Скочко // Мікробіол. журнал. – 2011 – Т.73, № 3 – С. 14-20.
3. Nitschke M. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces / M. Nitschke, L.V.Araújo, S.G. Costa, R.C. Pires, A.E. Zeraik, A.C. Fernandes, D.M. Freire, J. Contiero // Let. App. Microbiol. – 2009. – V. 49. – P. 241–247.

4. Rivardo F. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens / F. Rivardo, R.J. Turner, G. Allegrone, H. Ceri, M.G. Martinotti // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 83. – P. 541–553.

Препараты поверхностно-активных веществ (ПАВ) Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 (0,28 мг/мл) уменьшали количество прикрепленных клеток Bacillus subtilis БТ-2 разного физиологического состояния на кафеле на 38,7–45,8 % и линолеуме на 79,1–85,8 %, Escherichia coli ИЭМ-1 – на стали, пластике и кафеле на 41, 15 и 14 % соответственно. Такие препараты могут быть использованы как антиадгезивные компоненты дезинфицирующих средств.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, антиадгезивное действие*

A.B. Skochko, A.D. Konon, T.P. Pirog

RESEARCH OF ANTIADHESION PROPERTIES OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241

It was established that drugs of surface-active substances (SAS) of Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 in concentration 0,28 mg/ml reduced the number of attached cells of twenty-four-hour Bacillus subtilis BT-2 culture on ceramic tile per 41,3 % and linoleum per 82,4 %, Escherichia coli IEM-1 – on steel, plastic and ceramic tile per 41, 15 and 14 % respectively. It was shown that anti-adhesion activity of A. calcoaceticus IMB B-7241 SAS drugs caused a decrease in the number of attached cells of B. subtilis BT-2 depending on their physiological state, and effectively act on the spore culture (14.2% of attached cells on linoleum, 54.2% - on ceramic tile). Regardless of the physiological state of cells of B. subtilis BT-2 under the

influence of surfactant drugs observed stimulation of adhesion to plastic, and E. coli IEM-1 - on linoleum.

The results can be used for the development of disinfectants, in which the antiadhesive components may be the SAS of A. calcoaceticus IMB B-7241.

Keywords: *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, surfactants, anti-adhesion activity*

Одержане редколегією 01 березня 2011 р