

А.Д. Конон, магістрант

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Національний університет харчових технологій

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *RHODOCOCCLUS* *ERYTHROPOLIS* ЕК-1 НА АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ЧАЙНОГО ДЕРЕВА

Встановлено, що поверхнево-активні речовини (ПАР) Rhodococcus erythropolis ЕК-1 посилюють антимікробну дію олії чайного дерева на певні мікроорганізми (Candida 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 ПАР (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 .

Ключові слова: *поверхнево-активні речовини, олія чайного дерева, посилення антимікробних властивостей*

Установлено, что поверхностно-активные вещества (ПАВ) Rhodococcus erythropolis ЕК-1 усиливают антимикробное действие масла чайного дерева на некоторые микроорганизмы (Candida albicans Д-6, Aspergillus niger Р-3, Staphylococcus aureus БМС-1) благодаря собственным как антимикробным, так и эмульгирующим свойствам.

© А.Д. Конон, Т.П. Пирог, 2009

При одновременном внесении в суспензию исследуемых тест-культур (10^4 – 10^5 клеток/мл) эмульсии на основе масла чайного дерева (12,5 мкл/мл) и ПАВ (0,43 мг/мл) количество живых клеток через 15 мин экспозиции было на 0,7–66 % ниже, чем при обработке суспензии микроорганизмов препаратами масла без поверхностно-активных веществ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, масло чайного дерева, усиление антимикробных свойств

Основною властивістю олії чайного дерева є її антимікробна активність щодо патогенних мікроорганізмів [2]. Вона є ефективною у боротьбі із збудниками захворювань верхніх дихальних шляхів і ротової порожнини: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* [1, 3]. В інструкції з використання ефірної олії її рекомендують змішувати з харчовою содою для утворення емульсії. Разом з тим з літератури відомо, що мікробним поверхнево-активним речовинам (ПАР) також притаманні емульгувальні та антимікробні властивості [6], завдяки чому ці препарати можуть підвищувати ефективність впливу олії на патогенні мікроорганізми. Слід зазначити, що деякі ПАР мікробного походження синергічно посилюють дію антибіотиків на патогенні дріжджі [7].

Мета даної роботи – дослідження здатності поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, посилювати антимікробну дію ефірної олії чайного дерева.

Штам *R. erythropolis* ЕК-1 ізолювано із забруднених нафтою зразків ґрунту [4] 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.

Поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини визначали за допомогою напіваавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина). Принцип його роботи базується на визначенні сили втягування платинової пластинки, що зумовлена поверхневим натягом рідини. Для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у супернатанті культуральної рідини використовували показник «умовної концентрації ПАР» (ПАР*). Цей показник визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР.

Вміст ПАР у супернатанті визначали також ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча (хлороформ – метанол – 4М НСІ, 4:3:2) [5]. 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 препаратів 1–4 використовували такі тест-культури: дріжджі *Candida albicans* Д-6, гриби *Aspergillus niger* Р-3 та бактерії *Staphylococcus aureus* БМС-1. Чисті культури бактерій, грибів і дріжджів зберігаються у музеї живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій.

Визначення антимікробних властивостей препаратів здійснювали у рідкому середовищі (суспензійна культура). У вихідній суспензії досліджуваних добових тест-культур, вирощених на агаризованих середовищах (бактерії на м'ясо-пептонному агарі – МПА, гриби і дріжджі

на глюкозо-картопляному агарі – ГКА), визначали кількість живих клітин за методом Коха (колоній-утворювальні одиниці, КУО/мл). Потім суспензію тест-культур вносили у пробірки (3 мл), додавали по 640 мкл препаратів 1–4 і визначали за методом Коха кількість живих клітин (одразу після внесення препаратів та через 15 хв). Така тривалість експозиції була обрана згідно рекомендацій як оптимальна для прополіскування ротової порожнини препаратом ефірної олії чайного дерева. Концентрація олії чайного дерева у суспензіях досліджуваних тест-культур мікроорганізмів становила 12,5 мкл/мл, що відповідало концентрації, вказаній в інструкції з її використання.

Вживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у зразках, підданих дії препаратів, до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Експерименти показали, що умовна концентрація ПАР (ПАР*) у супернатанті культуральної рідини, одержаної після вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з етанолом, становила 2,0. Концентрація поверхнево-активних ліпідів у такому супернатанті (дані вагового методу) була 2,12 г/л.

Результати антимікробної дії препаратів з використанням олії чайного дерева і поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 на клітини бактерій *S. aureus* БМС-1 наведено у табл. 1. Як видно з наведених у табл. 1 даних, кількість живих клітин *S. aureus* БМС-1 за використання препарату на основі олії і ПАР (препарат 1) знижується на 7–9 % порівняно із результатами антимікробної дії препарату на основі олії і води (препарат 3) і на 5–7 % – у разі дії препарату на основі води і ПАР (препарат 4). Препарати на основі ПАР і води спричиняли трохи сильніший антимікробний вплив на клітини *S. aureus* БМС-1, ніж препарати на основі олії і води (вживання становило 87 і 91 % відповідно). Зазначимо, що за використання препаратів на основі ПАР (препарати 1 і 4) одразу після їхнього внесення у суспензію

мікроорганізмів спостерігали зниження на 10 % кількості живих клітин *S. aureus* БМС-1.

Таблиця 1

Вживання клітин *S. aureus* БМС-1 за дії препаратів на основі ефірної олії чайного дерева і поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1

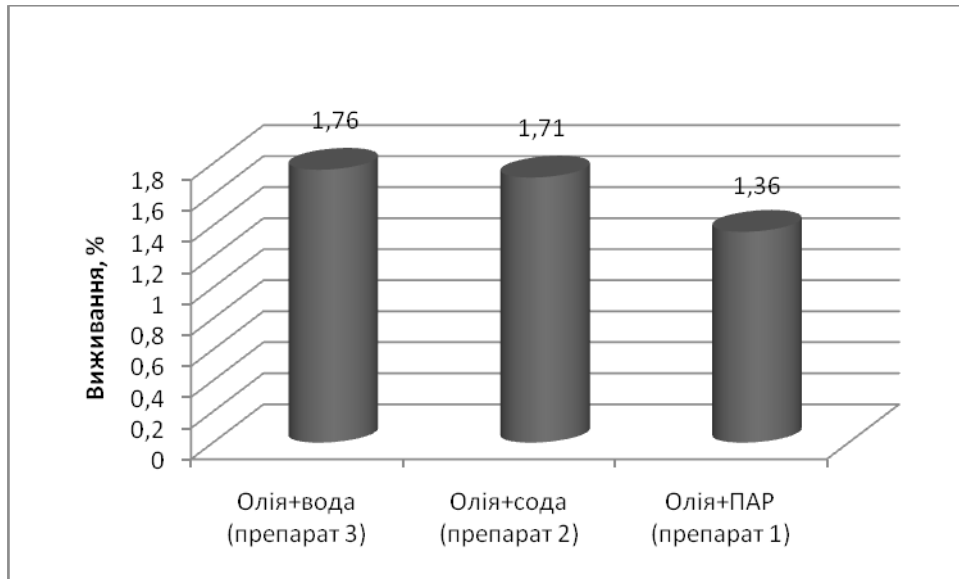
Препарат на основі	Вживання клітин (%) за тривалості експозиції (хв)	
	0	15
	Олії і ПАР (препарат 1)	91±0,4
Олії і води (препарат 3)	100±0,5	91±0,4
ПАР і води (препарат 4)	89±0,3	87±0,3

Примітка. Початкова концентрація клітин *S. aureus* БМС-1 (до внесення препаратів) становила $7,9 \cdot 10^4$ КУО/мл.

Отже, наведені у табл. 1 дані свідчать про посилення антимікробної дії олії чайного дерева на клітини бактерій *S. aureus* БМС-1 за присутності поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 в результаті їхніх як антимікробних, так і емульгувальних властивостей.

За обробки суспензії дріжджів *C. albicans* Д-6 препаратами 1–3 на основі ефірної олії чайного дерева спостерігали їхню сильну фунгіцидну дію: одразу після внесення препаратів кількість живих клітин знижувалася на 98,3–98,6 % і становила всього 1,36–1,76 % (рисунок). Як видно із даних, наведених на рисунку, сильнішу антимікробну дію на клітини дріжджів спричиняв препарат з використанням ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 (препарат 1). У цьому разі вживання клітин становило 1,36 %. Слід зазначити, що за обробки дріжджів препаратом 4 (ПАР без олії) вживання клітин становило 92 % (одразу після внесення) і 55 %

(через 15 хв експозиції), тобто було набагато вищим порівняно з використанням препаратів на основі олії.



Вплив препаратів на основі ефірної олії на виживання клітин дріжджів *C. albicans* Д-6.

Початкова концентрація клітин становила 10^5 КУО/мл.

Через 15 хв після обробки суспензії дріжджів препаратами 1 і 2 на основі олії чайного дерева і емульгатора (як соди, так і ПАР) кількість живих клітин зменшилася до 0,7–0,9 %. У разі використання препарату 3 (олія з водою) кількість живих клітин через 15 хв залишилася практично без змін (виживання становило 1,64 %).

Дані виживання клітин гриба *A. niger* Р-3 за дії препаратів 1–4 наведено у табл. 2. Цікаво зазначити, що у цьому разі не було виявлено антимікробної дії препарату 4 (препарат ПАР): виживання *A. niger* Р-3 становило 100 % й через 15 хв експозиції). 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.

Таблиця 2

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

Препарати на основі	Вживання 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* P-3 (до внесення препаратів) становила $3 \cdot 10^4$ КУО/мл.

Іншою цікавою особливістю дії досліджуваних препаратів на клітини *A. niger* P-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.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено посилення антимікробної дії ефірної олії чайного дерева на клітини

бактерій (*S. aureus* БМС-1), грибів (*A. niger* Р-3) і дріжджів (*C. albicans* Д-6) за присутності поверхнево-активних речовин, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Абрамян Дж.Г., Нанагюлян С.Г., Давтян М.М., Оганисян Е.Х.* Диагностика микозов у больных с поражением ЛОР–органов // Успехи медицинской микологии. – 2003. – Т.1, глава 2. – С. 62–63.
2. *Бородина А.В.* Сравнительный анализ антимикробной активности эфирных масел // Архив клинической экспериментальной медицины. – 2004. – Т. 13, № 1–2. – С. 65–67.
3. *Годовалов А.П., Быкова Л.П., Ожгибесов Г.П.* Значение грибов рода *Candida* при воспалительных заболеваниях дыхательных путей // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 7. – С. 10–12.
4. *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.
5. *Тарасенко Д.О.* Модифікація методу кількісного визначення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1. – Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 40–43.
6. *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.
7. *Mimee B., Labbe C., Pelletier R., Belanger R. R.* Antifungal Activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa* // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – V. 49. – P. 1597–1599.