

ANTIMICROBIAL ACTION OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 SURFACTANTS ON SOME CONDITIONALLY PATHOGENIC BACTERIA

I. Savenko, D. Andreyko, T. Pirog
National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241
Microbial surfactants
Antimicrobial properties
Minimum inhibitory concentration

Article history:

Received 15.02.2016
Received in revised form
04.03.2016
Accepted 20.03.2016

Corresponding author:

T. Pirog
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants relatively to conditionally pathogenic bacteria (*Proteus vulgaris* BT-1, *Staphylococcus aureus* BMC-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* AC-22) was established. The dependence of antimicrobial properties of surfactants on the nature of carbon source in the cultivation medium (ethanol, glycerol, n-hexadecane) and the presence of a yeast autolysate and certain microelements were determined. The elimination of yeast autolysate and microelements mix from the medium was accompanied by the decrease of antimicrobial properties of synthesized surfactants. The MIC value of surfactants synthesized on glycerol, ethanol and n-hexadecane over yeast autolysate and microelements relatively to the test-cultures was 34.0—67.5, 37.5—75.0 and 27.0—108.0 µg/ml, respectively.

АНТИМІКРОБНА ДІЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 НА ДЕЯКІ УМОВНО ПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ

І.В. Савенко, Д.В. Андрейко, Т.П. Пирог
Національний університет харчових технологій

У статті експериментально встановлено мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 щодо умовно патогенних бактерій (*Proteus vulgaris* BT-1, *Staphylococcus aureus* BMC-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* AC-22). Показано залежність антимікробних властивостей ПАР від природи джерела вуглецю в середовищі культивування (етанол, гліцерин, n-гексадекан) і наявності в ньому дріжджового автолізу та певних мікроелементів. Виключення зі складу поживного середовища дріжджового автолізу і суміші мікроелементів супроводжувалося зниженням антимікробних властивостей синтезованих ПАР. Значення МІК поверхнево-активних речовин, отриманих на гліцерині, етанолі та n-гексадекані за наявності дріжджового автолізу і мікроелементів, становило 34,0—67,5, 37,5—75,0 і 27,0—108,0 мкг/мл відповідно.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, мікробні поверхнево-активні речовини, антимікробні властивості, мінімальна інгібуюча концентрація.

Постановка проблеми. До небезпечних, умовно патогенних мікроорганізмів лікарняних приміщень належать бактерії родів *Proteus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* та *Enterobacter*, здатні спричиняти різноманітні захворювання [1—4]. Так, стафілококи вважаються найбільш поширеними збудниками інфекцій: *Staphylococcus aureus* є причиною більшості внутрішньолікарняних інфекцій, що зумовлюють виникнення післяопераційних ускладнень [1].

Серед інфекційних захворювань одними із найнебезпечніших вважають протейні інфекції. Бактерії роду *Proteus* є причиною гнійно-запальних процесів, хвороб шлунково-кишкового тракту, перебіг яких особливо важкий у дітей раннього віку. Крім того, *Proteus vulgaris* здатний підсилювати патогенну дію інших збудників захворювань [2].

З літератури [3] відомо, що не менш небезпечним умовно-патогенним мікроорганізмом є *Pseudomonas aeruginosa*, який спричиняє широкий спектр захворювань у людей: менінгіт, пневмонії, абсцеси печінки і мозку, запалення сечостатевої системи, харчові токсикоінфекції тощо. Величезну роль ці бактерії відіграють у гнійно-запальних ускладненнях післяопераційних ран та опіків, які практично не лікуються антибіотикотерапією і тому викликають летальні наслідки [3].

Ще одним досить небезпечним умовно-патогенним мікроорганізмом є *Enterobacter cloacae*, який хоч і входить до складу нормальної мікрофлори людини, проте досить часто викликає порушення шлунково-кишкового тракту та внутрішньолікарняні пневмонії. При потраплянні ентеробактерій у кровотік виникає септицемія — захворювання, в результаті якого ці мікроорганізми поширюються по всіх органах і системах людини [4].

Підвищення резистентності мікроорганізмів до антибіотиків і, як результат, неефективність антибіотикотерапії, спонукало дослідників до пошуку нових ефективних антимікробних засобів. З літератури відомо [5] про антимікробну дію мікробних ПАР. Раніше було досліджено антимікробні властивості препаратів ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо деяких мікроорганізмів [6—7], проте вплив цих ПАР на умовно патогенні бактерії не вивчали.

Мікробні ПАР є вторинними метаболітами і, як правило, синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук (аміно-, гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів). У попередніх дослідженнях [8] було показано залежність синтезу поверхнево-активних речовин від природи джерела вуглецевого живлення (етанол, гліцерин, *n*-гексадекан) та наявності факторів росту і певних мікроелементів у середовищі культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Мета дослідження. Вивчення антимікробних властивостей ПАР, синтезованих у різних умовах культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, щодо деяких умовно патогенних бактерій.

Матеріали і методи. Культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснювали в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35;

NaCl — 1,0; Na₂HPO₄·12H₂O — 0,6; KH₂PO₄ — 0,14; MgSO₄·7H₂O — 0,1, вода дистильована — до 1 л; рН 6,8—7,0. У середовище також додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка), що містив (г/100 мл): ZnSO₄·7H₂O — 1,1; MnSO₄·H₂O — 0,6; FeSO₄·7H₂O — 0,1; CuSO₄·5H₂O — 0,004; CoSO₄·7H₂O — 0,03; H₃BO₃ — 0,006; KI — 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) — 0,5 [8].

Як джерело вуглецю й енергії використовували етанол, *n*-гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка) та гліцерин — 1 % (об'ємна частка).

В одному з варіантів у середовище з етанолом і *n*-гексадеканом замість дріжджового автолізату і розчину мікроелементів вносили Cu²⁺ (0,16 мкмоль/л) і Fe²⁺ (3,6 мкмоль/л), а в середовище з гліцерином — Zn²⁺ (38 мкмоль/л), Cu²⁺ (0,16 мкмоль/л) і K⁺ у концентрації 0,21 ммоль/л, як описано у праці [8].

Культивування здійснювали у 750 мл колбах зі 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С впродовж 120 год. Як посівний матеріал використовували культуру *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з експоненційної фази росту, вирощену в рідкому середовищі наведеного вище складу з етанолом, *n*-гексадеканом та гліцерином у концентрації 0,5 % (об'ємна частка). Кількість інокуляту — 5 % від об'єму середовища (10⁴—10⁵ клітин/мл). Культивування здійснювали у 750 мл колбах зі 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 48 год.

Для досліджень використовували поверхнево-активні речовини, екстраговані з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ:метанол, 2:1), як описано раніше [6].

Як тест-культури під час визначення антимікробних властивостей ПАР використовували бактерії (*Proteus vulgaris* БТ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55, *Enterobacter cloacae* АС-22) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізували за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Визначення МІК здійснювали методом двократних серійних розведень у м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), як описано у [9]. Результати оцінювали візуально по помутнінню середовища: (+) — пробірки, де спостерігалось помутніння середовища, (–) — помутніння було відсутнє. МІК розчину ПАР визначали як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній, і в першій, де він був наявний.

Результати і обговорення. У табл. 1 і 2 наведено мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині, щодо тест-культур.

Експерименти показали, що виключення зі складу середовища дріжджового автолізату і суміші мікроелементів та заміна їх на сульфат міді, сульфат цинку і хлорид калію супроводжувалися зниженням показника мінімальної інгібуючої концентрації у 2,2—4,4 раза, за винятком МІК щодо *E. cloacae* АС-22, значення якого незалежно від умов культивування продуценту ПАР було практично однаковим і становило 34—37,5 мкг/мл (табл. 1 і 2).

Таблиця 1. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині за наявності дріжджового автолізу та мікроелементів

№ п/п	Розведення	ПАР, мкг/мл	Ріст тест-культури			
			<i>P.vulgaris</i> БТ-1	<i>E.cloacae</i> АС-22	<i>S.aureus</i> БМС-1	<i>P.aeruginosa</i> П-55
1	1:1	715	–	–	–	–
2	1:2	358	–	–	–	–
3	1:4	179	–	–	–	–
4	1:8	90	–	–	–	–
5	1:16	45	–	–	+	–
6	1:32	23	+	+	+	+
7	1:64	12	+	+	+	+
8	1:128	6	+	+	+	+
9	1:256	3	+	+	+	+
МІК			34	34	67,5	34

Примітки: табл. 1 і 2: «–» ріст відсутній, «+» ріст наявний.

Таблиця 2. Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР, синтезованих на гліцерині за наявності КСl, CuSO₄ і ZnSO₄

№ п/п	Розведення	ПАР, мкг/мл	Ріст тест-культури			
			<i>P.vulgaris</i> БТ-1	<i>E.cloacae</i> АС-22	<i>S.aureus</i> БМС-1	<i>P.aeruginosa</i> П-55
1	1:1	800	–	–	–	–
2	1:2	400	–	–	–	–
3	1:4	200	–	–	–	–
4	1:8	100	+	–	+	–
5	1:16	50	+	–	+	+
6	1:32	25	+	+	+	+
7	1:64	12	+	+	+	+
8	1:128	6	+	+	+	+
9	1:256	3	+	+	+	+
МІК			150	37,5	150	75

Схожі закономірності спостерігали при дослідженні антимікробних властивостей ПАР, синтезованих за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на *n*-гексадекані та етанолі (табл. 3). Так, мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин, одержаних на середовищі із сульфатом міді та заліза (37,5—265,0 мкг/мл), була вищою в 1,3—3,6 раза порівняно з МІК ПАР, синтезованих за наявності дріжджового автолізу та розчину мікроелементів (27—108 мкг/мл).

Таблиця 3. Мінімальна інгібуюча концентрація ПАР штаму ІМВ В-7241, синтезованих на етанолі і *n*-гексадекані

Субстрат	Наявність у середовищі факторів росту	МІК (мкг/мл) щодо			
		<i>P.vulgaris</i> БТ-1	<i>E.cloacae</i> АС-22	<i>S.aureus</i> БМС-1	<i>P.aeruginosa</i> П-55
1	2	3	4	5	6
Етанол	дріжджовий автолізат, розчин мікроелементів	75	75	75	37,5
	CuSO ₄ , FeSO ₄	135	135	265	135

1	2	3	4	5	6
n-Гексадекан	дріжджовий автолізат, розчин мікроелементів	27	27	108	108
	CuSO ₄ , FeSO ₄	37,5	70,5	141	141

Антимікробні властивості ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 також залежали і від природи джерела вуглецевого живлення (табл. 4). Так, поверхнево-активні речовини, синтезовані на гліцерині, ефективніше інгібували ріст досліджуваних тест-культур (МІК 34,0—67,5 мкг/мл), порівняно з ПАР, отриманими в аналогічних умовах культивування на етанолі і n-гексадекані, (МІК 37,5—75,0 і 27—108 мкг/мл відповідно).

Таблиця 4. Вплив джерела вуглецю на антимікробні властивості розчину ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Тест-культура	МІК (мкг/мл) за наявності ПАР, синтезованих на		
	гліцерині	Етанолі	n-гексадекані
<i>P. vulgaris</i> БТ-1	34	75	27
<i>E. cloacae</i> АС-22	34	75	27
<i>S. aureus</i> БМС-1	67,5	75	108
<i>P. aeruginosa</i> П-55	34	37,5	108

Примітка: середовище для культивування містило дріжджовий автолізат і мікроелементи.

Слід зазначити, що встановлені нами показники мінімальної інгібуючої концентрації ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо досліджуваних бактерій родів *Staphylococcus* та *Pseudomonas*, є значно нижчими (34—108 мкг/мл), порівняно з МІК ліпопептидів *Bacillus subtilis* МТСС 441 і рамноліпідів *P. aeruginosa* RWI (250 та 8000 мкг/мл) [10, 11]. МІК штаму ІМВ В-7241 також є нижчими щодо *S. aureus* БМС-1 (67,5—108 мкг/мл), ніж МІК поверхнево-активних речовин *P. aeruginosa* MR01 та *P. aeruginosa* MASH1 щодо *S. aureus* АТСС 29213 (128—512 мкг/мл) [12]. Цікавим виявився ще і той факт, що у [12] найвища (512 мкг/мл) досліджувана концентрація препаратів обох штамів не пригнічувала ріст *P. aeruginosa* АТСС 27853, на відміну від ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, МІК яких щодо *P. aeruginosa* П-55 становила 34—108 мкг/мл.

Висновки

Отримані дані свідчать про залежність біологічних властивостей поверхнево-активних речовин від умов культивування продуцента, що доводить необхідність досліджень з метою одержання препаратів із стабільними біологічними властивостями. Встановлено, що найефективнішими антимікробними агентами щодо всіх досліджуваних тест-культур виявилися ПАР, синтезовані *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на гліцерині (МІК 34,0—67,5 мкг/мл), що засвідчує можливість їх використання як ефективних антимікробних агентів у складі нових дезінфікуючих засобів.

Література

1. Cihalova K. Staphylococcus aureus and MRSA growth and biofilm formation after treatment with antibiotics and SeNPs / K. Cihalova, D. Chudobova, P. Michalek [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2015. — Vol. 16, # 10. — P. 24656—24672. doi: 10.3390/ijms161024656.

2. Wang Y., Pan X. Proteus In: Encyclopedia of food safety. — London: Academic Press, 2014. — Vol. 1. — 563 p.
3. Crousilles A. Which microbial factors really are important in Pseudomonas aeruginosa infections? / A. Crousilles, E. Maunders, S. Bartlett [et al.] // Future Microbiol. — 2015. — Vol. 10, # 11. — P. 1825—1836. doi: 10.3390/ijms161024656.
4. Wang H. Enterobacter cloacae infections after anterior cervical decompression and fusion: case study and literature review / H. Wang, L. Wang, Y. Yang [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. — 2015. — Vol. 8, # 3. — P. 3438—3446.
5. Пирог Т.П. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ Acinetobacter calcoaceticus ИМВ В-7241, Rhodococcus erythropolis ИМВ АС-5017 и Nocardia vaccinii ИМВ В-7405 / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, К.А. Береговая и др. // Микробиология. — 2014. — Т. 4, № 6. — С. 631—639.
6. Pirog T.P. Effect of surface-active substances of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241, Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017, and Nocardia vaccinii K-8 on phytopathogenic bacteria / T.P. Pirog, A.D. Konon, A.P. Sofilkanych [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. — 2013. — Vol. 49, # 4. — P. 360—367.
7. Pirog T. Intensification of surfactants' synthesis by Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017, Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 and Nocardia vaccinii K-8 on fried oil and glycerol containing medium / T. Pirog, A. Sofilkanych, A. Konon [et al.] // Food Bioprod. Proces. — 2013. — Vol. 91, # 2. — P. 149—157.
8. Пирог Т.П. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ Acinetobacter calcoaceticus ИМВ В-7241 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, О.Ю. Мащенко и др. // Микробиол. журнал. — 2013. — Т. 75, № 5. — С. 19—27.
9. Mazzola P. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents / P. Mazzola, A. Jozala, L. Lencastre-Novaes [et al.] // Braz. J. Pharm. Sci. — 2009. — Vol. 45, # 2. — P. 241—248. doi: org/10.1590/S1984-82502009002008.
10. Yalcyn E. Screening the antimicrobial activity of biosurfactants produced by microorganisms isolated from refinery wastewaters / E. Yalcyn, A. Ergene // J. Appl. Biol. Sci. — 2009. — Vol. 3, # 2. — P. 163—168.
11. Irfan M. In vitro synergistic effect of biosurfactant produced by Bacillus subtilis MTCC 441 against drug resistant Staphylococcus aureus / M. Irfan, S-K. Shahi, P. Sharma // J. Appl. Pharm. Sci. — 2015. — Vol. 5, # 3. — P. 113—116.
12. Lotfabad B. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous Pseudomonas aeruginosa strains / B. Lotfabad, F. Shahcheraghi, F. Shooraj // Jundishapur J. Microbiol. — 2013. — Vol. 6, # 1. — P. 29—35.

АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНО- АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ACINETOBACTER CALCOACETICUS ИМВ В-7241 НА НЕКОТОРЫЕ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ

И.В. Савенко, Д.В. Андрейко, Т.П. Пирог
Национальный университет пищевых технологий

В статье экспериментально установлена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) поверхностно-активных веществ (ПАВ) Acinetobacter calcoaceticus ИМВ В-7241 по отношению к условно патогенным бактериям (Proteus vulgaris БТ-1, Staphylococcus aureus БМС-1, Pseudomonas aeruginosa П-55, Enterobacter cloacae АС-22). Показана зависимость антимикробных свойств ПАВ от природы источника углерода в среде культивирования

(этанол, глицерин, *n*-гексадекан) и от наличия в нем дрожжевого автолизата и определенных микроэлементов. Исключение из состава питательной среды дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов сопровождалось снижением антимикробных свойств синтезированных ПАВ. Значение МИК поверхностно-активных веществ, полученных на глицерине, этаноле и *n*-гексадекане в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов, по отношению к исследуемым тест-культурам составило 34,0—67,5, 37,5—75,0 и 27,0—108,0 мкг/мл соответственно.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, микробные поверхностно-активные вещества, антимикробные свойства, минимальная ингибирующая концентрация.