

Х.А. Берегова, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38(044) 287 92 18, e-mail: khrystyia91@ukr.net

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН NOCARDIA VACCINII ІМВ В-7405 НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ТА ДРІЖДЖІВ ДО ПОВЕРХОНЬ СИЛІКОНОВИХ КАТЕТЕРІВ

Мета. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на адгезію деяких бактерій та дріжджів до фрагментів силіконових урогенітальних катетерів. **Методи.** Ступінь адгезії мікроорганізмів визначали як відношення кількості клітин на оброблених ПАР фрагментах катетерів до кількості клітин на контрольних (без обробки ПАР) зразках і виражали у відсотках. Концентрацію клітин визначали за методом Коха на м'ясо-пептонному та глюкозо-картопляному агарі. **Результати.** Встановлено, що адгезія клітин деяких бактерій (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) і дріжджів *Candida albicans* Д-6 на фрагментах урогенітальних силіконових катетерів, оброблених ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежала від концентрації і ступеня очищення ПАР, а також типу тест-культур. Обробка катетерів розчинами ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (0,05–0,08 мг/мл) супроводжувалася зниженням адгезії бактерій та дріжджів на 21–95% та 57–94% відповідно. **Висновки.** ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 можуть бути використані для створення ефективних препаратів, що знижують адгезію мікроорганізмів на поверхні матеріалів медичного призначення.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, адгезія, поверхня силіконових катетерів.

Відомо, що у 40% випадків причинами шпитальних інфекцій сечостатевої системи є урогенітальні катетери хворих, які перебувають у відділеннях інтенсивної терапії. Найчастіше у пацієнтів з шпитальними сечостатевими інфекціями виявляються грамнегативні бактерії *Escherichia coli* (25–31%) та *Enterococcus* sp. (15–16%) [1].

Показано [2, 11, 12], що з представників мікробіоти шкіри людини катетери найчастіше колонізують *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., а з рук медичного персоналу при порушенні асептики можуть потрапляти також *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus maltophilia*, *Candida albicans*. Особлива небезпека інфекцій, спричинених катетер-асоційованими мікроорганізмами, зумовлена утво-



ренням на поверхні або в середині катетера біоплівки. Відомо, що мікроорганізми у складі біоплівок набувають резистентності до антибіотиків та є багато стійкішими до дії дезінфектантів. Одним з механізмів формування біоплівки дріжджів роду *Candida* є їх здатність до зв'язування з білками (фібрoneктинами) шкіри та слизових оболонок. На ефективність адгезії мікроорганізмів впливає також природа матеріалу катетерів. Показано, що краще прикріплюються мікроорганізми до поліетилену та полівінілхлориду, гірше – силікону, тефлону та поліуретану [2].

Актуальним нині є пошук засобів, які б перешкоджали адгезії мікроорганізмів на поверхнях різних матеріалів медичного призначення, в тому числі на катетерах. Відомо [3–6, 10], що такими засобами можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), які попереджають прикріплення мікроорганізмів до поверхонь, руйнують архітектуру біоплівок, а також не викликають стійкості мікроорганізмів до антибіотиків [10]. Літературні дані свідчать, що механізм антиадгезивної дії ПАР може бути зумовлений підвищенням проникності клітинної мембрани, а також зміною поверхневого заряду клітин, і як наслідок, порушенням їх біологічної функції [3, 6].

Раніше із забруднених нафтою зразків ґрунту виділено бактерії, ідентифіковані як *Nocardia vaccinii* К-8 (ІМВ В-7405), встановлено їх здатність синтезувати метаболіти з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями [7, 8], які можуть бути використані в природоохоронних технологіях, а також як антимікробні агенти [7, 8, 14].

Мета роботи – дослідити вплив ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на адгезію деяких бактерій та дріжджів до силіконових катетерів.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були поверхнево-активні речовини, синтезовані штамом *N. vaccinii* ІМВ В-7405, який зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ. Як тест-культури для визначення антиадгезивних властивостей використовували штами бактерій *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2 і *Proteus vulgaris* ПА-12, а також дріжджі *Candida albicans* Д-6 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccinii ІМВ В-7405 вирощували в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка). Як джерело вуглецю використовували гліцерин у концентрації 1,5% (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5% гліцерину. Кількість інокуляту – 10% від об'єму середовища. Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.



У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини у вигляді супернатанту культуральної рідини і розчину ПАР, екстрагованих з супернатанту сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) [7, 8, 14], а також водну фазу, що залишилася після екстракції ПАР. Супернатант, розчин ПАР і водну фазу стерилізували 30 хв при 112 °С.

Для одержання супернатанту постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 45 хв при 700 g. Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом [7, 8, 14].

Визначення антиадгезивних властивостей здійснювали, як описано у роботі [6]. Для цього фрагменти (2 см) силіконових урогенітальних катетерів витримували 20 хв у 75% -ому розчині етилового спирту, потім поміщали у досліджувані розчини (супернатант культуральної рідини, розчин ПАР, водна фаза) і висушували упродовж 24 год в термостаті при 30 °С. Однодобові тест-культури бактерій та дріжджів вирощували на м'ясо-пептонному (МПА) і глюкозо-картопляному агарі (ГКА), відповідно, суспендували в 100 мл стерильної водогінної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені досліджуваними розчинами і необроблені (контрольні) фрагменти катетерів, витримували 2 год в термостаті при 30 °С, ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води, щоб змити неадгезовані клітини. Потім фрагменти катетерів поміщали у ємність із 20 мл стерильної водопровідної води і скляними кульками діаметром 3 мм, струшували 5 хв для змиву адгезованих клітин. Кількість клітин в отриманій суспензії визначали за методом Коха на МПА і ГКА. Ступінь адгезії мікроорганізмів визначали як відношення кількості клітин на оброблених супернатантом, розчином ПАР та водною фазою силіконових фрагментах до кількості клітин на контрольних зразках і виражали у відсотках.

Всі досліді проводили у трьох повторностях. Статистичне опрацювання експериментальних даних проводили за Лакінім [13]. Різницю середніх показників вважали достовірною при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Дані, наведені в табл.1, показують, що адгезія грамнегативних бактерій до фрагментів силіконових урогенітальних катетерів залежала від концентрації ПАР.

Дослідження показали, що розчин ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 виявився ефективнішим антиадгезивним агентом порівняно з супернатантом культуральної рідини: після обробки ним фрагментів катетерів адгезія більшості досліджуваних бактерій була в середньому на 40–50% нижчою, ніж після обробки супернатантом.

Відомо [10], що препарат псевдофактин II *Pseudomonas fluorescens* BD5 у концентрації 0,05 мг/мл знижував ступінь адгезії *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio harveyi* та дріжджів *Candida albicans* на 80–90%. Отже, ефект препаратів ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 порівняний з описаними в літературі даними.



Таблиця 1

Вплив ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на прикріплення грамнегативних бактерій до поверхонь силіконових катетерів

Table 1

Effect of *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant on attachment of gram-negative bacteria to silicone catheters

Досліджувані розчини	Концентрація ПАР, мг/мл	Кількість прикріплених клітин, %				
		<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>P. vulgaris</i> ПА-12	<i>Erwinia</i> sp. ТБ-4	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>E. cloacae</i> АС-22
Супернатант КР	0,08	79±4,0	56±2,8	72±3,6	68±3,4	32±1,6
	0,05	86±4,3	65±3,2	89±4,4	91±4,5	76±3,8
Розчин ПАР	0,08	20±1,0	5±0,3	28±1,4	21±1,0	24±1,2
	0,05	25±1,2	11±0,6	48±2,8	42±2,0	45±2,3

Примітка: КР – культуральна рідина, кількість клітин у контрольних зразках приймали за 100%.

Note: CF – culture fluid, cells number in control samples taken as 100%.

Результати, наведені в табл. 2, свідчать, що за обробки катетерів розчином ПАР (0,05 мг/мл) ступінь адгезії дріжджів *C. albicans* Д-6 знижувався на 88%, у той час як після обробки супернатантом культуральної рідини – лише на 59%.

Таблиця 2

Вплив ПАР штаму ІМВ В-7405 на адгезію клітин *Candida albicans* Д-6 до поверхонь силіконових катетерів

Table 2

Effect of strain ІМВ В-7405 surfactant on adhesion of *Candida albicans* Д-6 to silicone catheters

Досліджувані розчини	Концентрація ПАР, мг/мл	Кількість прикріплених клітин, %
Супернатант КР	0,08	Н.в.
	0,05	41±2,1
Розчин ПАР	0,08	43±2,2
	0,05	12±0,6

Примітка: КР – культуральна рідина, Н.в. – не визначали; кількість клітин у контрольних зразках приймали за 100 %.

Note: CF – culture fluid, N.d. – Not determined, cells number in control samples taken as 100%.



Зазначимо, що зі зниженням концентрації ПАР кількість прикріплених клітин *C. albicans* Д-6 зменшувалася.

Подальші експерименти показали, що у разі використання водної фази, що не містить ПАР, також спостерігали зменшення кількості прикріплених до фрагментів катетерів клітин досліджуваних бактерій та дріжджів (табл.3).

Таблиця 3

Адгезія бактерій та дріжджів на катетерах, оброблених водною фазою після екстракції ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Table 3

Adhesion bacteria and yeast on catheters treated with an aqueous phase after extraction of surfactant *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Розведення водної фази	Кількість прикріплених клітин, %					
	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>P.vulgaris</i> ПА-12	<i>Erwinia</i> sp. ТБ-4	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>E. cloaceae</i> АС-22	<i>C. albicans</i> Д-6
1:19	64±3,2	105±5,2	113±5,6	124±6,2	57±2,3	98 ± 4,9
1:29	85±4,3	135±6,7	124±6,2	138±6,9	70±3,5	33 ± 1,7

Припустимо, що це може бути зумовлене наявністю у водній фазі відмінних від ПАР метаболітів, яким притаманна антимікробна дія. Раніше [14] було встановлено, що водна фаза, яка залишилася після екстракції ПАР з супернатанту культуральної рідини штаму ІМВ В-7405, спричиняла антимікробну дію на фітопатогенні бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Pectobacterium*. Зазначимо, що у літературі є відомості про синтез антибіотиків представниками роду *Nocardia* [3, 5].

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що поверхнево-активним речовинам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (як у вигляді супернатанту культуральної рідини, так і розчину ПАР) притаманна антиадгезивна дія, завдяки чому вони можуть бути використані для створення антиадгезивних препаратів медичного призначення.

К.А. Береговая, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Кисв, 01601, Украина, тел.: +38(044) 287 92 18,
e-mail: khrystyia91@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ К ПОВЕРХНОСТЯМ СИЛИКОНОВЫХ КАТЕТЕРОВ

Реферат

Цель. Исследование влияния поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на адгезию некоторых бактерий и дрожжей к фрагментам силиконовых урогенитальных катетеров. **Методы.** Степень адгезии микроорганизмов определяли как отношение количества клеток на обработанных ПАВ фрагментах катетеров к количеству клеток на контрольных (без обработки ПАВ) образцах и выражали в процентах. Концентрацию клеток определяли по методу Коха на мясо-пептонном и глюкозо-картофельном агаре. **Результаты.** Установлено, что адгезия клеток некоторых бактерий (*Escherichia coli* IEM-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* AC-22, *Pseudomonas* sp. MI-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) и дрожжей *Candida albicans* Д-6 на фрагментах урогенитальных силиконовых катетеров, обработанных ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 зависела от концентрации и степени очистки ПАВ, а также типа тест-культур. Обработка катетеров растворами ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,05–0,08 мг/мл) сопровождалась снижением адгезии бактерий и дрожжей на 21–95% и 57–94% соответственно. **Выводы.** Таким образом, ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 могут быть использованы для создания эффективных препаратов, снижающих адгезию микроорганизмов на поверхности материалов медицинского назначения.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, адгезия, поверхности силиконовых катетеров.

Kh.A. Beregova, T.P. Pirog

National University of Food Technologies,
68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,
tel.: +38(044) 287 92 18, e-mail: khrystyia91@ukr.net

EFFECT OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 SURFACTANT ON ADHESION OF BACTERIA AND YEAST TO SILICONE CATHETERS

Summary

Aim. To investigate the effect of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 surface-active substances (surfactants) on adhesion of some bacteria and yeasts to fragments



urogenital silicone catheters. **Methods.** The degree of adhesion of microorganisms was determined as the ratio of the cells amount on treated by surfactants catheters fragments to the amount of cells in the control (without surfactant treatment) samples and expressed in percent. Cell concentration was determined by the method of Koch meat-peptone agar and glucose-potato agar. **Results.** It was shown that the attachment bacteria (*Escherichia coli* IEM-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) and yeast *Candida albicans* Д-6 to the fragments of urogenital silicone catheters treated with *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactants depended on the concentration and purification of surfactants, and the type of test cultures. Treatment catheters of *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant (0.05–0.08 mg/ml) was accompanied by decrease adhesion of bacteria and yeast by 21–95% and 57–94%, respectively. **Conclusions.** Thus, *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant can be used for development of effective preparations decreasing the adhesion of microorganisms on the surface of medical application.

Key words: surfactants, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, adhesion, silicone catheters.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Dusane D.H., Matkar P.K., Venugopalan V.P.* Cross-species induction of antimicrobial compounds, bio-surfactants and quorum-sensing inhibitors in tropical marine epibiotic bacteria by pathogens and biofouling microorganisms // *Curr. Microbiol.* – 2011. – Vol. 62, № 3. – P. 974–980.
2. *Finkel J.S., Mitchell A.P.* Genetic control of *Candida albicans* biofilm development // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 109–118.
3. *Imai T., Yazawa K., Tanaka Y., Mikami Y., Kudo T., Suzuki K.* Productivity of antimicrobial substances in pathogenic actinomycetes *Nocardia brasiliensis* // *Microbiol. Cult. Coll.* – 1997. – Vol. 13, № 2– P. 103–108.
4. *Kalyani R.K., Bishwambar M.N., Suneetha V.L.* Recent potential usage of surfactant microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // *J. Res. Pharm.* – 2011. – Vol. 2, № 8. – P. 11–15.
5. *Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Y.Venkateswarlu* Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL 113 // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 49, № 4. – P. 484–490.
6. *Monteiro A.S., Miranda T.T., Lula I., Denadai A.M., Sinisterra R.D., Santoro M.M., Santos V.L.* Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2011. – Vol. 84, № 2. – P. 467–476.
7. *Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O.* Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 on byproduct of biodiesel product // *Food Bioprod. Proces.* – 2013. – DOI 10.1016/j.fbp.2013.09.003.
8. *Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S.* Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter*



calcoaceticus IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium // Food Bioprod. Proces. – 2013. – Vol. 91, № 2. – P. 149–157.

9. Tawakoli P.N., Al-Ahmad A., Hoth-Hannig W., Hannig M., Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm // Clin. Oral. Investig. – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 841–850.

10. Tomasz J., Łukaszewicz M., Krasowska A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5 // BMC Microbiology. – 2012. – DOI: 10.1186/1471-2180-12-24.

11. Wang H.H., Schaffner D.W. Antibiotic resistance: how much do we know and where do we go from here? // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 20. – P. 7093–7095.

12. Warren J.W. Catheter-associated urinary tract infections. // Infect. Dis. Clin. – 2001. – Vol. 3, № 4. – P. 823–854.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия – М.: Высшая школа – 1990. – 352 с.

14. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В7405 на фитопатогенные бактерии // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – № 49, № 4. – С. 364–371.

Стаття надійшла до редакції 02.07.2014 р.

