

АНТИАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Никитюк Л.В., студентка

(Национальный университет пищевых технологий)

Установлена зависимость антиадгезивных свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 от длительности культивирования (5 и 7 суток). Установлено, что после обработки абиотических поверхностей (пластик, кафель, сталь, поливинилхлорид) препаратами ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,02-0,04 мг/мл), синтезированных на подсолнечном масле, адгезия бактерий *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 составляла в среднем 10–60% и зависела от типа абиотической поверхности и степени очищения препаратов ПАВ

Введение. Формирование микробных биопленок на различных поверхностях оборудования в пищевой промышленности и медицине является опасным явлением, поскольку микроорганизмы в их составе характеризуются повышенной резистентностью к различным биоцидам [1, 5, 8]. В последние годы особое внимание уделяется исследованию микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) как антиадгезивных агентов, способных предотвращать образование биопленок [6]. Ранее из загрязненных нефтью образцов почвы были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [4]. Установлена способность штамма синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами. Показана возможность их практического использования в природоохранных технологиях и в качестве антимикробных агентов [1, 4].

Цель данной работы – исследовать влияние поверхностно-активных веществ *N. vaccinii* IMB B-7405 на прикрепление клеток бактерий и дрожжей к различным поверхностям.

Материалы и методы. Объектом исследований был штамм бактерий *N. vaccinii* IMB B-7405, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины.

По химической природе внеклеточные ПАВ штамма IMB B-7405 являются комплексом нейтральных, амино- и гликолипидов. Нейтральные липиды представлены миколовыми и n-алкановыми кислотами, гликолипиды –

трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами [3].

В качестве тест-культур использовали бактерии *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, и дрожжи *Candida albicans* Д-6 из коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий.

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали в жидкой питательной среде (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1. В качестве источника углерода использовали подсолнечное масло в концентрации 2% (по объему). В среду культивирования дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5% (по объему).

В качестве посевного материала использовали культуру в экспоненциальной фазе роста, выращенную на среде приведенного выше состава с 1 % масла. Количество инокулята (10^4 – 10^5 кл/мл) составляла 10% от объема среды.

Культивирование *N. vaccinii* IMB B-7405 осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 5 и 7 сут.

Для исследований использовали следующие препараты поверхностно-активных веществ: препарат 1 – супернатант культуральной жидкости, для получения которого культуральную жидкость центрифугировали (5000 g, 45 мин); препарат 2 – раствор поверхностно-активных веществ, выделенных из супернатанта (препарата 1) трехкратной экстракцией смесью Фолча (метанол и хлороформ, 2:1) и последующим упариванием органического экстракта на роторной выпарной установке ИР-1М2

(Россия) при температуре 50°C и абсолютном давлении 0,5 атм до постоянной массы. Сухой остаток перерастворяли в стерильной водопроводной воде до первоначального объема.

Препараты 1 и 2 стерилизовали при 112 °С в течение 30 мин.

Для исследования антиадгезивных свойств [1, 7] очищенные пластинки исследуемых материалов (кафель, нержавеющая сталь, пластик, линолеум (поливинилхлорид) одинакового размера (1 см²) стерилизовали при 112°C в течение 40 мин. Односуточные тест-культуры бактерий и дрожжей, выращенные на мясо-пептонном агаре (МПА), суспендировали в 100 мл стерильной водопроводной воды, в суспензию помещали предварительно обработанные препаратами 1–2 и необработанные (контрольные) материалы, выдерживали 2 ч в термостате при 30°C, после чего ополаскивали 10 мл стерильной водопроводной водой для удаления неадгезированных клеток.

Антиадгезивные свойства препаратов 1 и 2 определяли спектрофотометрическим методом. Предварительно пластинки материалов обрабатывали метанолом (99%) в течение 15 мин для фиксации адгезированных клеток и высушивали при комнатной температуре, после чего помещали на 5 мин в 1% раствор генцианвиолета и ополаскивали

водопроводной водой. После высушивания материалы обрабатывали 10 мл 33% раствора уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность полученной суспензии десорбированных клеток. Количество (%) адгезированных клеток (адгезия) определяли как отношение оптической плотности суспензии, полученной из обработанных препаратами 1–2 образцов к оптической плотности контрольных образцов (100%).

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано ранее [2]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что препараты ПАВ, синтезированные в течение 7 сут, являются более эффективными антиадгезивными агентами по сравнению с препаратами, образуемыми на 5 сут культивирования штамма ИМВ В-7405. Так, адгезия вегетативных клеток *B. subtilis* БТ-2 на всех исследованных поверхностях после обработки супернатантом и раствором ПАВ (0,01 мг/мл), синтезированных на 7 сут, составляла 21–48%.

Таблица 1

Адгезия вегетативных клеток *B. subtilis* БТ-2 на материалах после обработки ПАВ, синтезируемыми в различных условиях культивирования *N. vaccinii* ИМВ В-7405

Время культивирования, сут	Препараты	Концентрация, мг/мл	Адгезия (%)			
			Пластик	Кафель	Сталь	Линолеум
5	1 (сапернатант)	0,04	83	92	85	64
		0,02	64	70	68	62
		0,01	92	87	88	72
	2 (раствор ПАВ)	0,04	66	45	45	42
		0,02	49	47	47	35
		0,01	71	63	50	54
7	1 (сапернатант)	0,04	56	64	46	38
		0,02	49	48	37	36
		0,01	43	45	25	21
	2 (раствор ПАВ)	0,04	53	61	48	38
		0,02	50	52	35	32
		0,01	48	45	24	23

Максимальный антиадгезивный эффект препаратов, образуемых на 5 сут культивирования штамма ИМВ В-7405,

наблюдался при более высокой концентрации ПАВ (0,02 мг/мл), чем синтезированных в течение 7 сут (0,01 мг/мл). Отметим, что

после обработки материалов препаратом 1, полученным на 5 сут культивирования штамма ИМВ В-7405, адгезия клеток *B. subtilis* БТ-2 была выше, чем после обработки раствором ПАВ той же концентрации (62–84 и 35–49 % соответственно).

Аналогичные результаты были получены при исследовании адгезии *C. albicans* Д-6. Обработка материалов раствором ПАВ (0,01 мг/мл), синтезируемых в течение 7 сут, сопровождалась снижением адгезии дрожжей на 70 %, а образуемых на 5 сут – 50–60%.

Из литературы [8] известно, что препараты ПАВ *Pseudomonas fluorescens* BD5 проявляли антиадгезивные свойства по отношению к *C. albicans* в концентрации 0,5 мг/мл, что на порядки выше, чем исследуемые

нами ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405.

Иные, чем для *B. subtilis* БТ-2 и *C. albicans* Д-6, закономерности наблюдались при исследовании адгезии клеток *E. coli* ИЕМ-1 на абиотические поверхности, обработанные препаратами ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (табл. 2). В этом случае наиболее эффективным антиадгезивным агентом оказался препарат 2 (раствор ПАВ, 0,02 мг/мл), синтезированный на 5 сут культивирования штамма ИМВ В-7405 (снижение адгезии тест-культуры на 82–97 %). Отметим, что ПАВ *P. fluorescens* BD5 снижал прикрепление клеток *E. coli* ATCC 25922 к полипропилену на 35 % при концентрации 0,25 мг/мл [8].

Таблица 2

Адгезия *E. coli* ИЕМ-1 на различных материалах после обработки препаратами ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405

Время культивирования, сут	Препараты	Концентрация, мг/мл	Адгезия (%)			
			Пластик	Кафель	Сталь	Линолеум
5	1 (сапернатант)	0,04	26	6	27	30
		0,02	21	30	13	10
		0,01	23	76	29	36
	2 (раствор ПАВ)	0,04	10	30	38	36
		0,02	10	16	17	10
		0,01	28	50	29	7
7	1 (сапернатант)	0,04	32	52	20	48
		0,02	32	38	34	35
		0,01	42	61	48	54
	2 (раствор ПАВ)	0,04	27	38	43	51
		0,02	30	47	33	35
		0,01	45	58	56	54

Выводы. Приведенные данные свидетельствуют о зависимости биологических свойств ПАВ от условий культивирования продуцента, также

возможности использования поверхностно-активных веществ *N. vaccinii* ИМВ В-7404 как составляющих антиадгезивных препаратов.

Литература

1. Пирог Т.П., Конон А.Д., Берегова Х. А., Шулякова М. А. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 // Микробиология. – 2014. – Т. 83. № 6. С. 631–639.
 2. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец И.В. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина // Микробиология. – 2012. – Т. 81. № 5. С. 611–618.
 3. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. К.: Наукова думка. – 2010. – 327 с.
 4. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. № 1. С. 58–63.

5. Dubey D., Rath S., Sahu M.C., Rout S., Debata N.K., Padhy R.N. A report on infection dynamics of inducible clindamycin resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from a teaching hospital in India // Asian. Pac. J. Trop. Biomed. – 2013. – V. 3. № 2. P. 148–153.
 6. Rodrigues L.R. Novel approaches to avoid microbial adhesion onto biomaterials // J. Biotechnol. Biomaterial. – 2011. – 1:104e. doi: 10.4172/2155-952X.1000104e.
 7. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Campos Takaki G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2011. – V. 84. № 1. P. 1–5.
 8. Janek T., Łukasiewicz M., Krasowska. A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5 // BMC Microbiol. – 2012. – 12:24. doi: 10.1186/1471-2180-12-24.

References

1. Pirog T.P., Conon A.D., Behovka H.A., Shulyakova M.A. Antyadhezivnye properties surface-aktivnykh substances Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241, Rhodococcus erythropolis IMV As-5017 and Nocardia vaccinii IMV B-7405 [Antyadhezivnye properties of surfactants Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241, Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017 and Nocardia vaccinii IMV B-7405] // Microbiology. - 2014. - T. 83. № 6. S. 631-639.
2. Pirog T.P., Conon A.D., Shevchuk T., Bilets I.V. Yntensyfykatsyya synthesis of surface-aktivnykh substances Acinetobacter calcoaceticus YMV B-7241 for mixtures hexadecane and glycerin [Intensification synthesis Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 surfactants in a mixture of hexadecane and glycerol] // Microbiology. - 2012. - T. 81. № 5. S. 611-618.
3. Podhorsky V.S., Iutinskaya G.O., Pirog T.P. Intensification of microbial synthesis technologies [Yntensyfykatsyya technology mykrobnogo synthesis]. K.: Naukova Dumka. - 2010. - 327 p.
4. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Voloshina I.N., Grechirchak N.N. Using ymmobylyzovannykh on keramzite cells nefteokyslyayushchykh microorganisms to clean water from oil [The use of immobilized cells Leca oxidizing microorganisms to purify water from oil] // J. Appl. Biochemistry and Microbiology. - 2005. - T. 41. № 1. S. 58-63.
5. Dubey D., Rath S., Sahu M.C., Rout S., Debata N.K., Padhy R.N. A report on infection dynamics of inducible clindamycin resistance of Staphylococcus aureus isolates from a teaching hospital in India // Asian. Pac. J. Trop. Biomed. - 2013. -V. 3. № 2. P. 148-153.
6. Rodrigues L.R. Novel approaches to avoid microbial adhesion onto biomaterials // J. Biotechnol. Biomaterial. - 2011. - 1:104e. doi: 10.4172/2155-952X.1000104e.
7. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Campos Takaki G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by Candida lipolytica UCP 0988 // Colloids Surf. B. Biointerfaces. - 2011. - V. 84. № 1. P. 1-5.
8. Janek T., Łukaszewicz M., Krasowska. A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium Pseudomonas fluorescens BD5 // BMC Microbiol. - 2012. - 12:24. doi: 10.1186/1471-2180-12-24.

Анотація

АНТИАДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405, СИНТЕЗОВАНИХ В РІЗНИХ УМОВАХ КУЛЬТИВУВАННЯ

Никитюк Л.В.

Встановлено залежність антиадгезивних властивостей поверхнево-активних (ПАР) речовин Nocardia vaccinii IMB B-7405 від тривалості культивування (5 і 7 діб). Встановлено, що після обробки абіотичних поверхонь (пластик, кахель, сталь, полівінілхлорид) препаратами ПАР N. vaccinii IMB B-7405 (0,01-0,02 мг/мл), синтезованих на олії, адгезія бактерій Escherichia coli IEM-1, Bacillus subtilis BT-2 становила у середньому 10-60 %, і залежала від типу абіотичної поверхні та ступеня очищення ПАР.

Abstract

THE RELEASE PROPERTIES OF THE SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 SYNTHESIZED IN DIFFERENT CONDITIONS OF CULTIVATION

Nikitiuk L.V.

The dependence of the antiadhesive properties of surface-active agents (surfactants) Nocardia vaccinii IMB B-7405 from the culture duration (5 and 7 days). It is found that after treatment abiotic surfaces (plastics, tiles, steel, polyvinylchloride) surfactant preparations N. vaccinii IMV B-7405 (0.02-0.04 mg / ml) synthesized in sunflower oil, Escherichia coli bacterial adhesion IEM 1, Bacillus subtilis BT-2 was on average 10-60%, depending on the type of surface and degree abiaticheskoy surfactant cleansing preparations

