

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON ANTIADHESIVE PROPERTIES OF *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 SURFACTANTS

L. Nikitiuk, T. Pirog

National University of Food Technologies

Key words:

Nocardia vaccinii IMV B-7405
Microbial surfactants
Antyadhesive agents
Biofilm

Article history:

Received 13.08.2015
Received in revised form 30.08.2015
Accepted 19.09.2015

Corresponding author:

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

ABSTRACT

The dependence of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 surfactants (SAS) antyadhesive properties on cultivation conditions, such as carbon sources nature (waste sunflower oil and technical glycerol) and process duration (5 and 7 days), was established. It was found that the adhesion of bacteria *Escherichia coli* IEM-1 and *Bacillus subtilis* BT-2 was in average 20—40 % after treatment of abiotic surfaces (plastic, tiles, steel, PVC) with surfactants *N. vaccinii* IMV B-7405 (0.02—0.04 mg/ml), synthesized on a technical glycerin, while SAS synthesized on sunflower oil reduced adhesion of bacteria on 16—90 %.

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА АНТИАДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

Л.В. Никитюк, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено залежність антиадгезивних властивостей поверхнево-активних (ПАР) речовин *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 від умов культивування: природи джерела вуглецю (відпрацьована соняшникова олія й технічний гліцерин) і тривалості процесу (5 і 7 діб). Встановлено, що після обробки абіотичних поверхонь (пластик, кахель, сталь, полівінілхлорид) препаратами ПАР *N. vaccinii* IMV B-7405 (0,02—0,04 мг/мл), синтезованими на технічному гліцерині, адгезія бактерій *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* BT-2 становила у середньому 20—40 %, тоді як ПАР, синтезовані на соняшниковій олії, знижували адгезію досліджуваних бактерій на 16—90 %.

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, мікробні поверхнево-активні речовини, антиадгезивні агенти, біоплівка.

Постановка проблеми. На сьогодні формування мікробних біоплівок є однією з проблем медицини та харчової промисловості. Наявність стійких до

відомих біоцидів мікробних спільнот зумовлює необхідність пошуку альтернативних препаратів для боротьби з ними [1, 4—6]. Як альтернативна заміна синтетичним ПАР розглядаються поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження, здатні запобігати формуванню біоплівок.

У попередніх дослідженнях було встановлено можливість штаму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 до синтезу поверхнево-активних речовин на різних вуглецевих субстратах, в тому числі й промислових відходах [4].

Слід зазначити, що мікробні поверхнево-активні речовини є вторинними метаболітами і, як правило, синтезуються у вигляді комплексу сполук ліпідної природи [3]. Так, за хімічною природою ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 є комплексом нейтральних гліко- і аміноліпідів [4]. З літератури відомо, що зміна умов культивування призводить до зміни співвідношення компонентів вторинних метаболітів і, як наслідок, впливає на їх біологічні властивості [3]. У той же час відомості про вплив умов культивування на властивості поверхнево-активних речовин мікробного походження є вкрай обмеженими.

У зв'язку з викладеним вище **мета статті** полягає в тому, щоб дослідити вплив природи джерела вуглецю й тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на антиадгезивні властивості ПАР.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження — штам, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України.

Як тест-культури використовували бактерії *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 та дріжджі *Candida albicans* Д-6 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснювали в рідкому мінеральному поживному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01. Як джерело вуглецю використовували технічний гліцерин (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.) та відпрацьовану після смаження м'яса соняшникову олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 2 % (об'ємна частка). У середовище культивування додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу з 0,5 % технічного гліцерину та відпрацьованої соняшnikової олії відповідно. Кількість інкуляту (10^4 — 10^5 кл/мл) становила 10 % від об'єму середовища. Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 проводили в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 5 та 7 діб.

Для досліджень використовували такі препарати:

- препарат 1 — супернатант культуральної рідини, для одержання якого культуральну рідину центрифугували (5000 g, 45 хв);

- препарат 2 — розчин очищених поверхнево-активних речовин, виділених із супернатанту (препарату 1) трикратною екстракцією сумішшю Фолча (метанол і хлороформ, 2:1) та упарюванням органічного екстракту на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному

тиску 0,5 атм до постійної маси. Сухий залишок перерозчиняли в стерильній водопровідній воді до початкового об'єму.

Препарати 1 та 2 стерилізували при 112 °С упродовж 30 хв. Для дослідження антиадгезивних властивостей [1] очищені пластинки досліджуваних матеріалів (кахель, сталь, пластик і полівінілхлорид (лінолеум) однакового розміру стерилізували при 112 °С упродовж 40 хв. Однодобові тест-культури бактерій і дріжджів, вирощених на м'ясо-пептонному агарі, суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води. В суспензію вносили попередньо оброблені і необроблені (контроль) препаратами 1 та 2 матеріали, витримували в термостаті впродовж 2 год при температурі 30 °С, після чого ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води для видалення неадгезованих клітин.

Далі визначали ступінь адгезії клітин за допомогою спектрофотометричного методу.

Пластинки матеріалів обробляли метанолом (99 %) протягом 15 хв для фіксації адгезованих клітин і висушували при кімнатній температурі, після чого поміщали на 5 хв в 1-відсотковий розчин генціанвіолета й ополіскували водопровідною водою. Після висушування матеріали обробляли 10 мл 33 % розчину оцтової кислоти і вимірювали оптичну щільність отриманої суспензії десорбованих клітин. Кількість (%) адгезованих клітин (адгезія) визначали як відношення оптичної щільності суспензії, отриманої з оброблених препаратами 1 і 2 зразків до оптичної щільності контрольних зразків (100 %).

Усі досліді проводили в трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано у [2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У табл. 1 наведено дані щодо адгезії досліджуваних тест-культур на різних абіотичних поверхнях, оброблених ПАР, синтезованих на відпрацьованій соняшниковій олії.

Результати досліджень показали, що як препарат 1 (супернатант), так і препарат 2 (розчин ПАР) знижували адгезію бактерій та дріжджів на всіх абіотичних поверхнях, причому особливої різниці між ефективністю обох препаратів не виявлено.

Встановлено, що незалежно від тривалості культивування антиадгезивні властивості як супернатанту (препарат 1), так і розчину ПАР (препарат 2) щодо спор *B. subtilis* БТ-2, практично не відрізнялись: адгезія становила у середньому 50—75 % (табл. 1). У той же час адгезія вегетативних клітин *B. subtilis* БТ-2 на абіотичних матеріалах після обробки препаратами 1 та 2, синтезованими упродовж 7 діб, була більш ніж у два рази нижчою порівняно з використанням ПАР, утворених на 5 добу. Варто зазначити, що антиадгезивний ефект (зниження адгезії вегетативних клітин *B. subtilis* БТ-2 на 52—78 %) досягався за невисокої (0,01 мг/мл) концентрації ПАР, синтезованих упродовж 7 діб.

Адгезія клітин *E. coli* ІЕМ-1 на абіотичних матеріалах, оброблених ПАР, синтезованими на 5 добу, була дещо нижчою порівняно з використанням препаратів поверхнево-активних речовин, утворених упродовж 7 діб (табл. 1).

У той же час найефективнішими антиадгезивними агентами щодо *C. albicans* Д-6 виявилися препарати, синтезовані на 7 добу культивування: відсоток адгезії при цьому становив 25—38 %.

Таблиця 1. Антиадгезивні властивості ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405, синтезованих на відпрацьованій соняшниковій олії

Тривалість культивування, діб	Тест-культури	Препарати	Матеріали, % адгезії			
			пластик	кахель	сталь	лінолеум
5	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)*	1	74	62	73	52
		2	62	67	76	49
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)**	1	73	84	78	62
		2	49	47	47	35
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1*	1	Н.в	16,6	47,7	10
		2	21,4	43,3	27,2	10
	<i>C. albicans</i> Д-6*	1	47,6	43,2	52,8	35
		2	42,8	40,5	44,2	30,1
7	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)*	1	56	71	74	60
		2	62	76	78	62
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)**	1	47,5	45	23,9	24
		2	49	45,4	24	23,4
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1*	1	30	47,0	33,3	35,4
		2	22,5	38,2	34	35,4
	<i>C. albicans</i> Д-6*	1	30,1	31,0	28,5	30,8
		2	38,0	36,4	28,5	25

Примітка. * — концентрація ПАР 0,02 мг/мл, ** — концентрація ПАР 0,01 мг/мл, н.в — не визначали.

Дані щодо прикріплення тест-культур до досліджуваних матеріалів, оброблених препаратами, синтезованими на технічному гліцерині, наведено у табл. 2. Слід зазначити, що незалежно від тривалості культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на технічному гліцерині як препарат 1, так і препарат 2 виявилися ефективнішими антиадгезивними агентами, ніж ПАР, синтезовані на відпрацьованій соняшниковій олії (табл. 1, 2)

Так, адгезія як спорових, так і вегетативних клітин штаму *B. subtilis* БТ-2 на всіх абіотичних матеріалах після обробки ПАР, отриманими на технічному гліцерині, становила в середньому 20—40 %, тоді як за наявності ПАР, синтезованих на соняшниковій олії, — 40—70 %.

Антиадгезивний ефект щодо клітин *E. coli* ІЕМ-1 препаратів ПАР, синтезованих як на відпрацьованій олії, так і на технічному гліцерині, практично не відрізнявся (див. табл. 1, 2). Проте адгезія *C. albicans* Д-6 була у 1,5—2 рази нижчою у разі обробки абіотичних поверхонь препаратами, отриманими на відпрацьованій соняшниковій олії.

Раніше [1] було встановлено, що ПАР *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 (0,12 мг/мл) у вигляді супернатанту культуральної рідини після вирощування на відпрацьованій соняшниковій олії знижували адгезію тест-культур *Proteus vulgaris* БТ-1, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas aeruginosa* П-55,

Enterobacter cloacae AC-22, *Candida albicans* Д-6 на поверхні зубних протезів на 50—58 %.

Таблиця 2. Адгезія бактерій і дріжджів під впливом ПАР, синтезованих на технічному гліцерині

Тривалість культивування, діб	Тест-культури	Препарати	% адгезії			
			пластик	кахель	сталь	лінолеум
5	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)**	1	28,3	50	66,6	28,5
		2	31,3	41,6	42,5	30,6
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)**	1	21,2	16,2	21,0	29,0
		2	41,4	37,2	15,7	9,6
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1*	1	24,5	43,3	24,4	29,7
		2	31,5	31	22,2	21,2
	<i>C. albicans</i> Д-6*	1	51,2	55,4	65,4	59,2
		2	58,2	45,7	49,3	47,3
7	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)*	1	38,7	26,4	43,8	28,3
		2	35,4	64,7	40,3	64,1
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)**	1	28,9	31,7	48,4	23,3
		2	15,7	19,5	18,1	16,6
	<i>E. coli</i> ІЕМ-1*	1	36,4	41	46,6	27,6
		2	21,0	33,3	28,8	25,5
	<i>C. albicans</i> Д-6*	1	62,6	64,3	68,6	66,2
		2	68,1	66,6	56,9	56,6

Примітка. * — концентрація ПАР 0,02 мг/мл, ** — концентрація ПАР 0,04 мг/мл.

Порівняння отриманих нами результатів показало, що описані у літературі ПАР проявляють свої антиадгезивні властивості у концентраціях на порядки вищих, ніж ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

У [5] досліджувалася антиадгезивна дія препаратів ПАР *Lactobacillus jensenii* та *Lactobacillus rhamnosus* на адгезію клітин *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. За обробки поверхні препаратом ПАР у концентрації 50 мг/мл кількість прикріплених клітин знизилась у середньому на 72—100 % [5]. Використання поверхнево-активних речовини *Pseudomonas aeruginosa* дозволило знизити адгезію *Staphylococcus aureus* на 67,8 % на поверхні полістиролу, при цьому концентрація рамноліпідів становила 1 % [6]. У праці [7] встановлено антиадгезивний ефект ПАР *Lactococcus lactis*. Так, збільшення концентрації ПАР до 4,5 мг/мл супроводжувалося зниженням адгезії *Candida sp* та *E. coli* на 44,4 та 54,2 % відповідно порівняно з використанням ПАР концентрацією 2,5 мг/мл.

Висновки

Встановлено, що антиадгезивні властивості поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежать від природи джерела вуглецю в середовищі культивування й тривалості процесу. Можливість використання як антиадгезивних агентів препаратів ПАР у вигляді супернатанту культуральної рідини та препаратів, синтезованих упродовж 5 діб, дає змогу виключити додаткові стадії очищення та знизити собівартість кінцевого продукту. Крім

того, одержані результати підтверджують необхідність дослідження впливу умов культивування на біологічні властивості мікробних ПАВ.

Література

1. Пирог Т.П. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB AC-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, Х.А. Берегова, М.А. Шулякова // *Микробиология*. — 2014. — Т. 83, № 6. — С. 631—639.

2. Подгорский В.С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В.С. Подгорский, Г.О. Иутинская, Т.П. Пирог. — Киев: Наук. думка, 2010. — 327 с.

3. *Batan I., Satputeal S., Patil R. et al.* Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production // *Front Microbiol.* — 2014. — V. 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00697.

4. *Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S.* 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 // *Food Bioprod. Proces.* — 2013. — V. 91, № 2. — P. 149—157.

5. *Sambanthamoorthy K., Feng X., Patel R., Patel S., Parnavitana C.* Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens // *BSM Microbiology*. — 014.14:197 [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/19>.

6. *Zezi do Valle Gomes M., Nitschke M.* Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria // *Food Control*. — 2012. — doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.025.

7. *Richlin Machado T., Ajaz haja Mohideen R., Prabhavanthi P., Saravanakumari M.* Antiadhesive, antimicrobial and biodegradability assay of a lipopeptide biosurfactant from *Lactococcus lactis* // *Int. J. Sci. Innov. Discov.* — 2013. — V. 3, № 4. — P. 478—483.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АНТИАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Л.В. Никитюк, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

*В статье определена зависимость антиадгезивных свойств поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 от условий культивирования: природы источника углерода (отработанное подсолнечное масло и технический глицерин) и длительности процесса (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), синтезированными на техническом глицерине, адгезия бактерий *Escherichia coli* IEM-1, *Bacillus subtilis* БТ-2 составляла в среднем 20—40 %, в то время как ПАВ, синтезированные на подсолнечном масле, снижали адгезию исследуемых бактерий на 16—90 %.*

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, микробные поверхностно-активные вещества, антиадгезивные агенты, биопленка.