

ANTIADHESIVE ACTIVITY OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 PREPERATIONS WITH VARIOUS DEGREES OF PURIFICATION

К. Chebotaryova

National University of Food Technologies

Key words:

Extracellular metabolites
Antiadhesive properties
Biosurfactants
Acinetobacter calcoaceticus
IMV B-7241

Article history:

Received 19.01.2013
Received in revised form
17.02.2013
Accepted 18.03.2013

Corresponding author:

E-mail:
katrielen@mail.ru

ABSTRACT

Different preparations of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 with various degrees of purification reduced *Candida albicans* D-6, *Bacillus subtilis* BT-2 and *Escherichia coli* IEM-1 adhesion on the surface of prosthetic material. It was also proved that the degree of cell adhesion of studied microorganisms depended on the type of material, microorganism and the surfactant concentration in preparations. The preparation of surface-active substances (0.36 mg/ml) reduced the adhesion on the silicone base *C. albicans* D-6 by 85, *B. subtilis* BT-2 — 91.2; the acrylic material *C. albicans* D-6 — 96.8, *B. subtilis* BT-2 — 97.5 %. The same concentration reduced the adhesion of *E. coli* IEM-1 on the acrylic material by 88.6, and on the silicone basis (0.0036 mg/ml), by 93.6 %.

АНТИАДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 РІЗНОГО СТУПЕНЯ ОЧИЩЕННЯ

К.В. Чеботарьова

Національний університет харчових технологій

Встановлено, що препарати поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241 різного ступеня очищення запобігали адгезії Candida albicans Д-6, Bacillus subtilis БТ-2 та Escherichia coli ІЕМ-1 на поверхню зубного протезного матеріалу. Доведено, що ступінь адгезії клітин досліджуваних мікроорганізмів залежав від типу матеріалу, тест-культури та концентрації поверхнево-активних речовин у препаратах. Препарат ПАР (0,36 мг/мл) знижував кількість адгезованих на силіконовий базис клітин C. albicans Д-6 на 85, B. subtilis БТ-2 — 91,2; акриловий матеріал C. albicans Д-6 — 96,8, B. subtilis БТ-2 — 97,5 %. Адгезію клітин E. coli ІЕМ-1 за цієї ж концентрації ПАР на акриловий матеріал знижено на 88,6, а на силіконовий базис (0,0036 мг/мл ПАР) — на 93,6 %

Ключові слова: антиадгезивні агенти, поверхнево-активні речовини, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Однією з проблем стоматології є контамінація протезів, що може призводити до інфікування тканин людини, тому важливим є пошук засобів, що запобігають адгезії мікроорганізмів та формуванню біоплівки. Новітніми антиадгезивними агентами можуть бути поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження [6, 9].

Так, в останні роки вчені звертають увагу на можливість використання ПАР як антимікробних агентів замість антибіотиків, до яких швидко набувають резистентності мікроорганізми [6]. Окрім того, поверхнево-активним речовинам притаманна здатність до біодеградації вже існуючої біоплівки та попередження процесу її утворення, що свідчить про можливість їх використання як антиадгезивного покриття [8, 9]. При цьому дія ПАР полягає в зміні заряду поверхні, внаслідок чого до обробленого даними сполуками матеріалу не адгезуються клітини [9].

Зазначимо, що найбільш небезпечною є можливість адгезії бактерій на імплантатний матеріал, зокрема, на зубні протези. При цьому існує ризик їх інфікування, оскільки даний імплантат безпосередньо контактує із слизовою оболонкою ротової порожнини людини. Тому необхідним є постійне механічне очищення протезів та захищення від можливої мікробної контамінації. У зв'язку з чим важливим є пошук агентів, здатних запобігати адгезії мікроорганізмів на поверхню протезів.

Раніше із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 [4], який депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології Національної академії наук України за номером ІМВ В-7241. Встановлено здатність *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 синтезувати низькомолекулярні ПАР на гідрофобних та гідрофільних субстратах. Досліджено хімічний склад ПАР, які є комплексом гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів [4]. Встановлено оптимальні умови культивування штаму ІМВ В-7241, які забезпечують максимальний синтез ПАР [4].

Попередніми дослідженнями на кафедрі біотехнології і мікробіології встановлено антимікробні властивості ПАР штаму ІМВ В-7241 у вигляді супернатанту культуральної рідини щодо *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2, *Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3 та досліджено адгезію *B. subtilis* БТ-2 та *E. coli* ІЕМ-1 на різні матеріали (лінолеум, кахель, сталь, пластик) після їх обробки супернатантом, що містить ПАР [3, 5].

Мета даної роботи — дослідження ролі поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 різного ступеня очищення в адгезії мікроорганізмів на матеріал зубних протезів.

Культивування бактерій *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; рН 6,8–7,0.

Як джерело вуглецю використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка), додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Розчин мікроелементів має такий склад солей (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03, H_3BO_3 — 0,006, KI — 0,0001, ЕДТА (Трилон Б) — 0,5.

Як посівний матеріал використовували культуру *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 з кінця експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу з 1 % етанолу. Посівний матеріал вносили у концентрації 10 % від загального об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах на качалках (320 об/хв, t 30 °C) впродовж 120 год.

Синтез ПАР оцінювали за такими показниками: поверхневий натяг супернатанту культуральної рідини, умовна концентрація ПАР (ПАР* безрозмірна величина), концентрація позаклітинних ПАР (г/л) [4].

Використовували такі препарати:

Препарат 1 — супернатант культуральної рідини, для одержання якого культуральну рідину центрифугували (5000 g, 45 хв).

Препарат 2 — розчин ПАР, отриманий із супернатанту (препарат 1) екстракцією сумішшю Фолча (метанол:хлороформ, 2:1) з наступним упарюванням органічних екстрактів на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 60°C і абсолютному тиску 0,5 атм до постійної маси. Сухий залишок перерозчиняли в стерильному фосфатному буфері (0,1 М, рН 7,0).

Препарат 3 — водна фаза після екстракції препарату 2 сумішшю Фолча.

У дослідженнях як тест-культури використовували *C. albicans* Д-6, *B. subtilis* БТ-2 та *E. coli* ІЕМ-1 з колекції живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій. Такий вибір тест-культур зумовлений рядом факторів. Так, першими на поверхні зубів адгезуються грам-позитивні, рухливі, факультативно анаеробні мікроорганізми (у тому числі *B. subtilis*). Розвиток яких призводить до утворення наддесняної бляшки, що спричиняє пародонтоз [2]. *C. albicans* існує на поверхнях у складі конгломератів. Розвиваючись на слизових оболонках людини, дріжджі спричиняють кандидоз і формують біоплівки [7]. Як і *C. albicans*, клітини *E. coli* швидко адгезуються на різних поверхнях (кераміка, сталь, скло, протези), тобто на всіх матеріалах, використовуваних у медицині. Небезпечним розвиток *E. coli* на зубних протезах стає через можливість інфікування ротової порожнини та потрапляння бактерій в шлунково-кишковий тракт, де вони спричиняють геморагічний коліт, надійного лікування якого досі не знайдено [2, 8].

Для дослідження антиадгезивних властивостей матеріал зубних протезів ополіскували у дистильованій воді і стерилізували при 112 °С, після чого обробляли досліджуваними препаратами 1 – 3 та поміщали на 24 год у термостат при 30 °С. Потім попередньо оброблені зубні протези ополіскували 10 мл стерильної дистильованої води для видалення залишків препарату.

Тест-культури бактерій та дріжджів суспендували у 100 мл стерильної водопровідної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені і не оброблені (контрольні) матеріали, витримували 2 год у термостаті. Контрольні і попередньо оброблені матеріали ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води, щоб змити неадгезовані клітини. Матеріал зубних протезів поміщали у колбу із 20 мл стерильної водопровідної води і кульками бісеру. Струшували 5 хв, щоб змити адгезовані клітини. Отриману суспензію розсівали на м'ясо-пептонний агар (для бактерій), сусло-агар (для дріжджів) за методом Коха, інкубували 24 год при температурі 30 °С (*C. albicans* Д-6) та 37 °С (*E. coli* ІЕМ-1 і *B. subtilis* БТ-2).

Всі досліди проводили у трьох повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили по Лакіну [1].

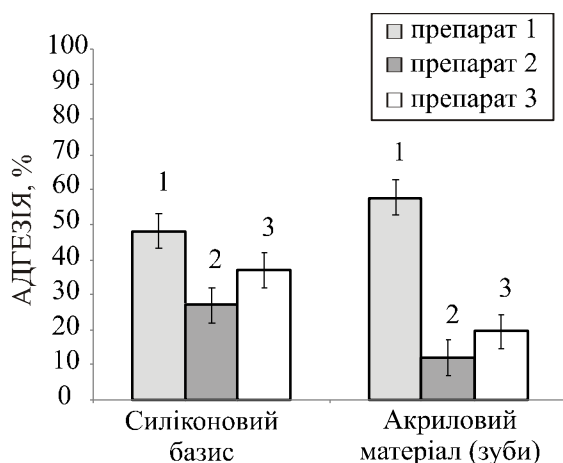
З наведених у таблиці результатів видно, що із зниженням концентрації досліджуваних препаратів адгезія як бактеріальних, так і дріжджових клітин підвищувалась. Найнижчий ступінь адгезії *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2 (15 і 8,8 % відповідно) на силіконовий базис спостерігали у разі використання розчину очищених ПАР у концентрації 0,36 мг/мл.

За цієї ж концентрації адгезія *C. albicans* Д-6 на акриловий матеріал становила всього 3,2 %. Зазначимо, що навіть за зниження концентрації ПАР у препаратах 1 і 2 до 0,018 мг/мл спостерігали значний антиадгезивний ефект у разі обробки силіконового базису суспензією *B. subtilis* БТ-2.

Вплив позаклітинних метаболітів *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на адгезію клітин *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2 на протези зубів

Препарат	Концентрація ПАР у препаратах *, мг/мл	Адгезія (%)			
		Силіконовий базис		Акриловий матеріал (зуби)	
		<i>C. albicans</i> Д-6	<i>B. subtilis</i> БТ-2	<i>C. albicans</i> Д-6	<i>B. subtilis</i> БТ-2
1	0,36	40,0±2,0	14,4±0,7	9,0±0,45	37,0±1,9
	0,036	56,0±2,8	12,6±0,6	54,0±2,7	5,2±0,26
	0,018	87,0±4,4	18,0±0,9	Н. в.	3,8±0,19
2	0,36	15,0±0,5	8,8±0,44	3,2±0,16	2,5±0,12
	0,036	20,0±1,0	24,0 ±1,1	52,0±2,6	Н. в.
	0,018	85,0±4,3	42,0±2,1	79,0±4,0	1,9±0,10
3	без розведення	69,0±3,5	10,0±0,5	38,0±1,9	21±1,1
	1:9	59,0±3,0	15,0±0,8	72,0±3,6	5,2±0,26
	1:19	93,0±4,7	23,0±1,2	100,0±5,5	7,0±0,4

Примітка. «*» — для препарату 3, що не містить ПАР, проводили ряд розведень; «Н. в.» — не визначали. Кількість клітин у контрольному, не обробленому препаратами варіанті приймали за 100 %.



Вплив позаклітинних метаболітів *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на адгезію клітин *E. coli* ІЕМ-1

Кількість клітин у контрольному, не обробленому препаратами варіанті приймали за 100 %. Концентрація ПАР у препараті 1 і 2 становила 0,0072 мг/мл.

11,4 %, відповідно. Подальші експерименти показали, що навіть за зниження концентрації ПАР у препараті 2 до 0,0072 і 0,0036 мг/мл ступінь адгезії *E. coli* ІЕМ-1 на силіконовий базис знижувався до 27 і 6,4 % відповідно, а на акриловий матеріал залишався незмінним у діапазоні концентрації 0,036 – 0,0072 мг/мл і становив 31 % за концентрації ПАР 0,0036 мг/мл у препараті 2.

Варто зазначити, що попередніми дослідженнями на кафедрі біотехнології і мікробіології було встановлено антиадгезивну дію супернатанту культуральної рідини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо ряду мікроорганізмів [4]. Так, препарати ПАР (0,28 мг/мл) знижували кількість адгезованих клітин *B. subtilis* БТ-2 на лінолеумі та кафелі на 82,4 та 41,3 % відповідно, адгезію *E. coli* ІЕМ-1 на сталеві пластинки на 41 %.

Зазначимо, що в ході досліджень щодо запобігання адгезії мікроорганізмів на зубні протези не виявлено суттєвої різниці між використанням препарату 1 (супернатант) та препарату 2 (розчин ПАР), що свідчить про можливість виключення з технологічної схеми стадії додаткового очищення препарату.

Висновки

Найбільш ефективно адгезію на поверхню протезного матеріалу знижував розчин ПАР. Так, у концентрації 0,36 мг/мл адгезія *C. albicans* Д-6 та *B. subtilis* БТ-2 на силіконовий базис знизилась на 85 – 91,2, на акриловий матеріал на 96,7 – 97,5 % відповідно. Розчин ПАР (0,0036 – 0,0072 мг/мл) ефективно знижував адгезію *E. coli* ІЕМ-1 — на акриловий базис на 88, на силіконовий базис на 93,4 %.

Література

1. Лакін Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакін — М.: «Высшая школа», 1990. — 352 с.
2. Мюллер Х.П. Пародонтология / Х.П. Мюллер, [за ред. А.М.Політун]. — Л: «ГалДент», 2004. — 256 с.
3. Пирог Т.П. Дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на деякі мікроорганізми / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.П. Софілканич, А.Б. Скочко // Мікробіол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 3. — С. 14 – 20.
4. Пирог Т.П. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ / Т.П. Пирог, С.И. Антонюк, Е.В. Карпенко, Т.А. Шевчук // Прикладная биохимия и микробиология. — 2009. — Т.45, № 3. — С. 304 – 310.

Усі досліджувані препарати ефективніше знижували адгезію на силіконовий базис і акриловий матеріал клітин *B. subtilis* БТ-2, ніж *C. albicans* Д-6 та *E. coli* ІЕМ-1, що можна пояснити різним хімічним складом їх поверхневих структур.

Встановлено, що антиадгезивна дія притаманна і препарату 3 (водна фаза). Це явище можна пояснити тим, що штам ІМВ В-7241 синтезує відмінні від ПАР антиадгезивні метаболіти.

На наступному етапі досліджень аналізували антиадгезивну дію препаратів 1 – 3 *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо *E. coli* ІЕМ-1 (рисунок).

За концентрації ПАР 0,36 мг/мл у препараті 1 і 2 адгезія клітин *E. coli* ІЕМ-1 на силіконовий базис становив 41 і 64, а на акриловий матеріал 56 і

5. Пирог Т.П. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.Б. Скочко // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 24–38.

6. Fracchia L. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications — Present Status and Future Potentials / L. Fracchia, [etc.] // Biomedical Science, Engineering and Technology / edited by D. N. Ghista — Rijeka, Croatia: «InTech», 2012. — P. 325–370.

7. LaFleur M.D. *Candida albicans* Biofilms, Heterogeneity and Antifungal Drug Tolerance / M.D. LaFleur // The Open Mycology Journal. — 2011. — Vol. 5. — P. 21–28.

8. Lee J.H. Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus* sp. BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation / J.H. Lee, [etc.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2012. — Vol. 96, N 4. — P. 1071–1078.

9. Rodrigues L.R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices / L.R. Rodrigues // Adv. Exp. Med. Biol. — 2011. — Vol. 715. — P. 351 – 367.

АНТИАДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ ПАР АСИНЕТОВАСТЕР CALCOACETICUS ИМВ В-7241 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ОЧИЩЕНИЯ

К.В. Чеботарева

Национальный университет пищевых технологий

Установлено, что препараты поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 предотвращали адгезию *Candida albicans* Д-6, *Bacillus subtilis* БТ-2 и *Escherichia coli* ИЕМ-1 на поверхность зубных протезов. Было установлено, что адгезия клеток исследуемых микроорганизмов зависела от типа материала, тест-культуры и концентрации поверхностно-активных веществ в препаратах. Препарат ПАВ (0,36 мг/мл) снижал адгезию на силиконовый базис *C. albicans* Д-6 на 85, *B. subtilis* БТ-2 — 91,2; акриловый материал *C. albicans* Д-6 — на 96,8, *B. subtilis* БТ-2 — 97,5 %. Адгезию *E. coli* ИЕМ-1 при такой же концентрации ПАВ на акриловый материал снижено на 88,6, а на силиконовый базис (0,0036 мг/мл ПАВ) — на 93,6 %.

Ключевые слова: внеклеточные метаболиты, антиадгезивные свойства, поверхностно-активные вещества, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241.