

УДК 615.362.357:615.324:615.33

О. О. СТРЕМОУХОВ

Національний фармацевтичний університет

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ СКРИНІНГ КОМПЛЕКСІВ РІЗНИХ ВИДІВ ЖОВЧІ

Представлені результати вивчення мікробіологічної активності фракцій жовчі тварин. Виявлена виражена антимікробна активність ліпофільного комплексу жовчі по відношенню до *Candida albicans*. Наявність та спектр антимікробної активності водного залишку методом «тест-об'єктів» показали як бактеріостатичний, так і бактеріоцидний ефекти при терміні експозиції 20 хв.

Ключові слова: жовч тварин; ліпофільний комплекс; глікопротеїди; антимікробна активність; мікробіологічний скринінг

ВСТУП

На сучасному етапі втручання людей у навколишнє середовище стало носити особливо інтенсивний і, як правило, негативний характер. Масоване забруднення навколишнього середовища під дією техногенного пресингу призвело до дуже серйозних змін природних біоценозів на всіх рівнях, в тому числі мікробіоценозів як людини, так і тварин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як джерела сировини для мікробіологічного скринінгу використовували комплекси, отримані з жовчі великої рогатої худоби (ЖВt), свиней (ЖSs) і курей (ЖGg). Як препарат порівняння використовували жовч медичну консервовану [1-3]. Для дослідження використовували 5 тест-культур мікроорганізмів: референс-штами бактерій – *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* CCM 885-653.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження антимікробної активності ліпофільного комплексу (ЛК) жовчі проводили по відношенню до ряду культур мікроорганізмів, для чого наважку ЛК жовчі розчиняли у ДМСО до створення концентрацій 1 % і 0,1 %.

Використовували методи серійних розведень у щільному поживному середовищі, метод «тест-об'єктів» та метод «колодязів» або «лунок».

Метод серійних розведень у щільному поживному середовищі дає можливість визначити мінімальну концентрацію розчину (МПК), пригнічуючи ріст певного штаму збудника, який полягає в приготу-

ванні ряду послідовних розведень ЛК (1 % і 0,1 %) у поживному середовищі з внесенням в усі розведення досліджуваної культури. Пригнічення зростання мікробів певною концентрацією ЛК у поживному середовищі показує ступінь чутливості мікроорганізму. На чашці Петрі зі щільним поживним середовищем визначається чутливість великої кількості штамів.

Перед постановкою досліду м'ясопептонний агар розплавляли на водяній бані і охолоджували до 50-60°C.

Для постановки досліду в чашках Петрі брали 1 об'єм, що містить певне розведення субстанції ЛК і 9 об'ємів розплавленого і охолодженого м'ясопептонного агару, ретельно перемішували у пробірках і виливали у чашку Петрі. У контрольну пробірку з м'ясопептонним агаром замість розчину препарату вносять 1 об'єм стерильної очищеної води. Приготовлені таким чином чашки Петрі, кожна з яких містить певну концентрацію препарату, ділили на сектори, на кожен з яких засівали випробуваний штам. Посів робили бактеріальною петлею. Посіви бактерій інкубували в термостаті при 37°C протягом 18-24 годин, дріжджоподібного гриба *Candida albicans* – протягом 24-48 годин, після чого розраховували результати.

Показником рівня антимікробної активності досліджуваних субстанцій ЛК слугувала МПК. За МПК препарату для даного штаму приймають ту, при якій відсутні ознаки росту мікробної культури на поверхні поживного агару. Результати дослідження антимікробної активності представлені в табл. 1.

Як видно з даних табл. 1, ЛК виявляє широкий спектр антимікробної активності по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. Особливий науковий інтерес викликає виражена дія ЛК жовчі по відношенню до *Candida albicans*.

© Стремоухов В. В., 2013

МПК ДОСЛІДЖУВАНИХ ЛК РІЗНИХ ВИДІВ ЖОВЧІ (%)

Препарат	Тест-культури мікроорганізмів				
	S.aureus	E.coli	P.aeruginosa	B.subtilis	C.albicans
ЛК ЖВt	0,1	1	0,1	0,1	0,1
ЛК ЖSs	1	1	0,1	0,1	0,1
ЛК ЖGg	1	1	0,1	0,1	0,1

Антимікробну активність ЛК визначали методом «колодязів». Для цього методу використовували ЛК у нативному стані без розведень. Як препарат порівняння використовували препарат «Жовч медична консервована» (ЖМК).

Метод «колодязів» заснований на дифузії досліджуваних препаратів в агаризоване поживне середовище. Чашки Петрі встановлювали на горизонтальну поверхню, наливали 10 мл незараженого, так званого «голодного» агару. Після застигання шару на нього поміщали стерильні циліндри з нержавіючої сталі (висота 10 мм, внутрішній діаметр 6 мм) і заливали їх «зараженим» агаром об'ємом 15 мл. Для цього розтопленій і охолодженій агар додали до агарових змивів добової культури. Густину суспензії визначали за стандартом каламутності № 5 з наступним розведенням до 500 тис. мікробних тіл у 1 мл.

Після застигання другого шару агару циліндри виймали, до лунок, що утворилися, вносили досліджувані субстанції ЛК по 0,3±0,05 мл. В одній чашці Петрі випробовували активність 3 експериментальних зразків і контролю. Антимікробну активність кожного зразка вивчали у трикратному повторенні дослідів. Посіви тест-культур бактерій витримували у термостаті при 37°C протягом 18-24 годин, *Candida albicans* – протягом 24-48 годин. Після чого розраховували результати.

Вимірювали зони затримки росту тест-мікроба, виразно проявлених навколо лунок. Якщо випробувана мікробна флора чутлива до однієї з субстанцій ЛК, навколо відповідного диска утворювалася зона затримки росту, яка корелювала з активністю ЛК. Діаметри зон затримки росту мікробів навколо дисків вимірювали, долучаючи діаметр самих дисків, за допомогою лінійки з точністю до 1 мм. Поодинокі колонії або тонка плівка зростання всередині зони затримки росту не враховуються. Відсутність зони затримки росту мікроба навколо диска свідчить про

те, що випробуваний штам нечутливий до даного комплексу. Результати середньостатистичного дослідження представлені в табл. 2.

При зоні затримки росту мікроба діаметром до 10 мм результат розцінювався як відсутність антимікробної активності. Зона затримки росту мікроба більше 10 мм вказувала на наявність антимікробної активності. Чим більше зона затримки росту, тим вища чутливість мікроорганізмів до досліджуваної субстанції. Високочутливими до даної субстанції (препарату) вважають мікроорганізми, які при його дії дають зони затримки росту, що перевищують 25 мм, чутливими – 15-25 мм, малочутливими – 11-15 мм.

Отримані результати показали помірну антимікробну активність досліджуваних ЛК і препарату порівняння (ЖМК). Нижчий за теоретично очікуваний рівень антимікробної активності ЛК жовчі може бути пояснений їх слабкою здатністю дифузії в агар у зв'язку з їх густиною, в'язкою консистенцією та значним вмістом жирних кислот: 1,5 % – в ЛК жовчі ВРХ, 1,25 % – в ЛК жовчі свиней, 1,70 % – в ЛК жовчі курей.

При аналізі результатів треба враховувати, що до препарату порівняння (жовч медична консервована) додані антисептики: формалін у концентрації 0,01 %, фурацилін у спирті – 0,99 % та 9,9 % спирту, що у загальному процентному відношенні становить 12 %.

Отримані нами експериментальні зразки являють собою композицію із суми жовчних кислот, окремих жирних кислот і мікроелементів. Таким чином, виявлена у них антимікробна активність обумовлена тільки їхнім складом без додавання антисептиків та консервантів.

Для дослідження антимікробної активності глікопротеїнового комплексу (ГПК) та водного залишку (ВЗ) жовчі у концентраціях 1 % і 0,1 % також використовували метод серійних розведень у щільному поживному середовищі. Кінцеве розведення ВЗ з ЖВt

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЛК МЕТОДОМ «ЛУНОК»

Препарат	Діаметр зон затримки росту тест-культур мікроорганізмів, мм				
	S.aureus	E.coli	P.aeruginosa	B.subtilis	C.albicans
ЛК ЖВt	15,2±0,55	0	0	14,2±0,55	0
ЛК ЖSs	13,2±0,55	0	0	13,8±0,55	0
ЛК ЖGg	15,8±0,68	0	0	14,3±0,68	0
ЖМК	13,6±0,68	12,6±0,68	0	13,8±0,55	0

Таблиця 3

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ГПК І ВЗ ЖОВЧІ РІЗНИХ ВИДІВ

Препарат	Концентрація, %	Тест-культури мікроорганізмів				
		S.aureus	E.coli	P.aeruginosa	B.subtilis	C.albicans
ГПК ЖВt	1	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
ГПК ЖSs	1	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
ГПК ЖGg	1	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+
ВЗ ЖВt	1:20	-	+	+	+	-

Примітка. + зростання тест-культури мікроорганізму; - відсутність росту тест-культури мікроорганізму.

у співвідношенні до розчинника складало 1:20. Результати дослідження антимікробної активності ВЗ представлені в табл. 3.

Результати досліджень показали відсутність антимікробної активності у ГПК жовчі у досліджених концентраціях. Отримані дані можуть бути пояснені присутністю значного вмісту водорозчинного крохмалю (до 80 %), що використовується при отриманні даної серії фракцій.

Для ВЗ ЖВt виявлено антибактеріальну активність відносно *Staphylococcus aureus* і *Candida albicans* у розведенні препарату 1:20. Антимікробний ефект цієї субстанції щодо інших використаних тест-культур можливо нівельований її великим розведенням, що обумовлено методичними особливостями застосованого методу. Для визначення антимікробної активності ВЗ ЖВt нами було використано метод «тест-об'єктів», який застосовують для визначення антимікробної дії дезінфектантів і антисептиків зовнішнього застосування.

Для цього методу приготування бактеріальних тестів здійснювали у такий спосіб: випрана біла бавовняна тканина оброблялась спиртом протягом 30 хв. Тканину, незаражену таким чином, прополіскували, сушили, прасували, розрізали на правильні прямокутники по 10×5 мм, укладали по 20-30 шт. у чашки Петрі та стерилізували. Тести заражали 500-мільйонною мікробною суспензією, для чого використовували змиви однодобових агарових референс-штамів 5 тест-культур бактерій. Стерильні шматочки тканини занурювали у мікробну суспензію на 20-25 хв, після чого витягували стерильним пінцетом, просушували між листами стерильного фільтрованого паперу, витримували 15-20 хв у термостаті при температурі 36-37°C. Тести поміщали у пробірки, в які попередньо було внесено по 5 мл досліджуваних субстанцій, і витримували від 20 хв до 1 год, висіваючи через кожні 20 хв. Виймаючи тест-об'єкти у відповідний термін (через 20, 40 і 60 хв), їх двічі промивали у стерильній воді, занурюючи у пробірку з поживним бульйоном і ставили на 6-8 днів. Помутнілий бульйон висівали на поживний агар для ідентифікації культури. Для кожної експозиції використовували по 3 тести. Як конт-

Таблиця 4

АНТИМІКРОБНИЙ ЕФЕКТ ВЗ ЖВt

Тест-культури мікроорганізмів	Контроль культур	Час експозиції тест-об'єкта у фракції, хв		
		20	40	60
S.aureus	+	+	-	-
E.coli	+	+	-	-
P.aeruginosa	+	-	-	-
B.subtilis	+	+	-	-
C.albicans	+	+	-	-

Примітка. - мікробостатичний ефект фракції; + зростання тест-культури мікроорганізму.

роль життєздатності тест-культур використовували «заражені» батистові тести, не оброблені досліджуваним ВЗ. Наявність та спектр антимікробної активності ВЗ ЖВt методом «тест-об'єктів» показали як бактеріостатичний, так і бактеріоцидний ефекти. Отримані дані представлені у табл. 4.

На різних термінах експозиції заражених батистових тестів ВЗ ЖВt показали затримку росту тест-культур мікроорганізмів, тобто мікробостатичний ефект. При цьому затримка росту *Pseudomonas aeruginosa* зафіксована на всіх часових термінах, починаючи з 20-хвилинної експозиції. При подальшому висіві вмісту пробірок з ВЗ і тест-об'єктами спостерігався ріст мікроорганізмів, що свідчило про відсутність передбачуваного мікробоцидного ефекту. Проте на 40 хв експозиції спостерігався виражений мікробоцидний ефект по відношенню до п'яти штамів мікроорганізмів.

Антимікробну активність ВЗ ЖВt підтверджували також методом «лунок». Для цього методу використовували ВЗ у нативному стані без розведень. Використовували референс-штами 5 тест-культур мікроорганізмів.

Як препарат-референт використовували препарат «Жовч медична консервована». Умови дослідження були аналогічними дослідженню ЛК ЖВt, свиней та курей. В результаті було виявлено різний ступінь активності по відношенню до штамів мікроорганізмів (табл. 5).

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ВЗ ЖВt МЕТОДОМ «ЛУНОК»

Препарат	Діаметр зон затримки росту тест-культур мікроорганізмів, мм				
	S.aureus	E.coli	P.aeruginosa	B.subtilis	C.albicans
ВЗ ЖВt	16,6±0,68	14,6±0,68	0	16,6±0,68	13,8±0,55
ЖМК	13,6±0,68	12,6±0,68	0	13,8±0,55	0

Як видно з табл. 5, середній ступінь чутливості лежить в межах від 15 до 17 мм по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus subtilis*. ВЗ ЖВt проявляла менший ступінь активності – від 13 до 16 мм по відношенню до *Escherichia coli* та *Candida albicans*.

Потрібно відмітити, що препарат-референт «Жовч медична консервована» має у своєму складі консерванти, які збільшують її активність по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та *Bacillus subtilis*.

ВИСНОВКИ

Таким чином, для отриманих ЛК, ГПК та ВЗ різних видів жовчі виявлені антимікробні властивості, що створює перспективу для розробки комплексних препаратів широкого спектра фармакологічної дії з антимікробними властивостями на їх основі.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Barsuk D. A. Poluchenie i mikrobiologicheskaja aktivnost' proizvodnyh zhelchnyh kislot / D. A. Barsuk, A. A. Stremoukhov // Aktual'ni pitannja stvo-rennja novih likars'kih zasobiv: [tez. dop. vseukr. nauk.-prakt. konf. stud. ta mol. vchenih, 23-24 kvit. 2009 р., м. Харків]. – Х.: Вид-во НФаУ, 2009. – С. 27.
2. Klimnjuk S. I. Kombinirovannoe dejstvie antibiotikov-aminoglikozidov i zhelchnyh kislot na stafilokokki : avtoref. dis. kand. med. nauk. – Minsk, 1980. – 24 с.
3. Silverman J. Bile acids; co-mutagenic activity in the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test: brief communication / J. Silverman, A. W. Andrews // J. Natl. Cancer Inst. – 1977. – Vol. 59. – P. 1557-1559.

УДК 615.362.357:615.324:615.33

А. А. Стремоухов

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ КОМПЛЕКСОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖЕЛЧИ

В статье представлены результаты изучения микробиологической активности фракций желчи животных. Выявлена выраженная антимикробная активность липофильного комплекса желчи по отношению к *Candida albicans*. Наличие и спектр антимикробной активности водного остатка методом «тест-объектов» показали как бактериостатический, так и бактерицидный эффекты при сроке экспозиции 20 мин.

Ключевые слова: желчь животных; липофильный комплекс; гликопротеиды; антимикробная активность; микробиологический скрининг

UDC 615.362.357:615.324:615.33

A. A. Stremoukhov

MICROBIOLOGICAL SCREENING COMPLEXES OF DIFFERENT TYPES OF GALL

This article presents the results of the study of microbial activity fractions bile animals. A substantial antimicrobial activity of the lipophilic complex bile towards *Candida albicans* has been founded. Availability and range of antimicrobial activity of the aqueous residue by means of the method «test-objects» showed bacteriostatic and bactericidal term effects of exposure during 20 minutes.

Key words: animal bile; lipophilic complex glycoproteins; antimicrobial activity; microbiological screening

Адреса для листування:
61146, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Національний фармацевтичний університет.
Тел. 8(0572) 679208. Моб. 0504011347.
E-mail: astrapharm@ukr.net.

Надійшла до редакції:
25.11.2013 р.