

Изменение физиолого-биохимических характеристик микроорганизмов при действии новых соединений фуранонового ряда

Маргулис Анна Борисовна, кандидат биологических наук, доцент;
Абрамова Дарья Сергеевна, аспирант;
Ильинская Ольга Николаевна, доктор биологических наук, профессор
Казанский (Приволжский) федеральный университет

Одним из процессов, объясняющих поведение бактерий как целостного организма является феномен под названием Quorum Sensing (QS) - особый тип регуляции экспрессии генов, зависящий от плотности популяции бактерий. Он основан на действии низкомолекулярных сигнальных молекул различной природы, аутоиндукторов (АИ), которые накапливаются в культуре при высоких плотностях популяции бактерий. В качестве АИ выступают молекулы гомосеринлактона (АГЛ), аналогами которых являются низкомолекулярные соединения – фураноны. Известно, что соединения фураноновой природы способны конкурировать с АГЛ за участок связывания с рецепторными белками LuxR типа [9]. В этом случае можно говорить о том, что структура этих соединений близка сигнальной молекуле АИ, и их взаимодействие с участком связывания АГЛ с рецепторным белком не приведет к активации этого белка.

Действие фуранонов приводит к подавлению различных клеточных процессов, регулируемых QS: биолюминесценции *Vibrio fischeri*; продукции факторов вирулентности у *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, образования биопленок [7].

В настоящее время серьёзной проблемой в области медицины является широкое распространение устойчивых форм микроорганизмов, снижающее эффективность применения антибактериальных препаратов. Особенную трудность представляет повышенная лекарственная устойчивость бактерий в биоплёнках. К примеру, оппортунистический патоген *Serratia marcescens* часто является возбудителем тяжелых инфекций мочеполовых путей у госпитализированных больных.

Лекарственные средства, направленные на подавление QS систем, в отличие от классических антимикробных лекарств (прежде всего, антибиотиков), не обладают бактерицидным или бактериостатическим действием на патогенные бактерии и поэтому не создают селективного давления, ведущего к образованию резистентных к антибактериальным веществам форм патогенных бактерий. В последнее время за рубежом образованы биотехнологические компании, которые ставят своей целью разработку средств, ингибирующих QS регуляцию и, вследствие этого, снижающих патогенность бактерий.

Кроме возможного использования соединений фураноновой природы в качестве ингибиторов QS, большое внимание уделяется исследованию процессов активации этого процесса в целях повышения продуктивности штаммов бактерий, являющихся основными производителями антибиотических веществ и/или пигментов. Как известно, актиномицеты рода *Streptomyces* способны продуцировать и экскретировать во внешнюю среду множество продуктов своего метаболизма, в том числе и антибиотики, в частности, пептиды / гликопептиды, тетрациклины, полиены, макролиды, феназин, антрахинон, лактоны и другие. [3]. Они могут обладать бактериостатическим или бактериолитическим, а также фунгицидным и гербицидным действием [4].

Так как процесс выделения антибиотических веществ у стрептомицетов является плотно-зависимым процессом, то исследование влияния фуранонов на изменение активности выделения антибиотиков может быть полезным для использования их в производстве в качестве веществ, влияющих на качество и выход целевого продукта.

Приведенные данные показывают, что производные фуранонов перспективны для получения на их основе терапевтических агентов, которые направлены против патогенности бактерий. Однако большинство испытанных к настоящему времени соединений, способных подавлять QS-регуляцию, токсичны для человека [7], для микроорганизмов [2], влияют на активность протеолитических ферментов [5].

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было оценить влияние производных фуранонов на физиолого-биохимические процессы у бактерий.

1. Определить токсические эффекты исследуемых производных фуранонов, определить их мутагенные эффекты.

2. Идентифицировать видовую принадлежность используемых в работе стрептомицетов.

3. Охарактеризовать изменение пигментообразования у стрептомицетов при действии фуранонов.

4. Описать влияние фуранонов на изменение антибиотической активности стрептомицетов в отношении *Micrococcus lysodeiolicus* и *Serratia marcescens*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces nashvillensis*, *Micrococcus lysodeiolicus*, *Serratia marcescens* и *Salmonella typhimurium* TA 100 (для теста Эймса).

В работе применяли модифицированные бромом и хлором производные фуранонов. Соединения синтезированы на кафедре Органической химии КФУ под руководством к.х.н., доцента Курбангалиевой А.Р. Производные фуранонов условно обозначены 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12.

В работе использовались два штамма актинобактерий рода *Streptomyces*, условно обозначенных как номер 3 и номер 6, видовая принадлежность которых изначально была нам неизвестна.

Определение актинобактерии, характеризующейся образованием и выделением в среду коричневого пигмента (*Streptomyces nashvillensis*), проводили с использованием диагностических сред, на которых выращивался микроорганизм, после чего проводился анализ морфологических и культуральных признаков.

Для оценки морфологического строения мицелия и репродуктивных структур культуры актинобактерии выращивали на среде, наиболее благоприятной для спороношения, а именно на минеральном агаре (среда Гаузе) в чашках Петри и на скошенном агаре в пробирках. На 7-14 день роста культуры проводили микроскопию мицелия, предварительно приготовив препарат методом отпечатка. Анализировались такие морфологические характеристики

как форма цепочек спор и характер поверхности их оболочек.

Важными признаками, определяющими принадлежность исследуемого стрептомицета к тому или иному виду, являются окраска воздушного и субстратного мицелия, а также наличие меланоидных пигментов.

Цвет воздушного и субстратного мицелия определяли на минеральном агаре, так как у подавляющего большинства изученных культур стрептомицетов окраска мицелия на других средах (глюкозоаспарагиновом, сахарозно-нитратном, глюкозо-нитратном агарах) не отличается от той, что образуется при выращивании микроорганизма на минеральном агаре. Определение цвета проводили на 7 и 14 день роста культуры [1].

Образование меланоидных пигментов определяли на пептонно-дрожжевом агаре, содержащем железо, на 2 – 4 сутки роста. Если при этом образовывался темно – зелено – бурый, бурый или черный растворимый пигмент, то считалось, что культура образует меланоидные пигменты [1].

Полученные сведения о морфологическом и культуральном строении культуры стрептомицета учитывались при его определении до вида с помощью пособия [1]. Данная литература содержит описания и ключи для определения культур наиболее распространенных и наиболее разнообразных по составу родов семейства Streptomycetaceae.

Определение *Streptomyces violaceoruber* проводили при помощи прибора для идентификации микроорганизмов Bruker Daltonik MALDI Biotyper. Данный метод определения основан на масс-спектрометрическом анализе, т.е. получении спектра белкового профиля клеток микроорганизмов и сравнении его с эталонным спектром в базе данных [8].

Культуры стрептомицетов для определения подготавливали следующим образом:

1. 7-дневную культуру стрептомицетов высевали на чашки Петри с агаризованной минеральной средой Гаузе, с расчётом получения отдельных колоний.

2. Осуществляли пересев отдельных колоний стрептомицетов с чашек Петри в колбы с жидкой минеральной средой Гаузе.

3. Инкубировали колбы с культурой стрептомицетов 5 дней при температуре 28°C.

Для определения возможных токсических эффектов в работе применяли тест на определение токсичности по отношению к микроорганизмам. В работе использовали тестерный штамм *Salmonella typhimurium* TA 100.

Для определения мутагенных эффектов фуранонов был проведен стандартный тест Эймса без метаболической активации на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA 100.

Сущность теста заключается в том, что тестерные штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* культивируют на специальной среде, на которой могут расти лишь мутанты этих штаммов, у которых произошла мутация от аукоотрофности по гистидину к прототрофности. Без внешних воздействий такие мутации происходят с низкой частотой [6].

Образование пигмента определяли у грамположительных и грамотрицательных бактерий на примере *Streptomyces violaceoruber*, *Streptomyces nashvillensis*, *Micrococcus lysodeiaticus* и *Serratia marcescens*. Сущность данного

эксперимента заключалась в выявлении влияния фуранона на процесс пигментообразования штаммов.

1) Определение пигментообразования у *Streptomyces violaceoruber* и *Streptomyces nashvillensis*

Схема эксперимента:

1) Посев бактерий на жидкую среду (Гаузе). 2) Приготовление растворов фуранона в концентрациях: 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. 3) В подготовленные чашки Петри разливали плотную питательную среду (Гаузе), после чего методом наслаивания наносили на поверхность среды готовые растворы фуранона по 100 мкл на чашку. Для того чтобы раствор впитался в среду, чашки оставляли при комнатной температуре на два часа. 4) Посев бактерий с жидкой среды на подготовленные чашки Петри с плотной средой и растворами фуранона. В качестве контроля – посев бактерий на плотную питательную среду без добавления веществ. Инкубация полученных образцов в термостате в течение 5 суток при температуре 30°C. 5) Визуальное наблюдение образования пигмента на плотных средах (на 5 и 8 сутки эксперимента).

2) Определение пигментообразования у *Micrococcus lysodeiaticus* и *Serratia marcescens*

Схема эксперимента:

1) Посев ночной культуры бактерий на жидкую среду (МПБ). 2) Приготовление растворов фуранона в концентрациях: 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. 3) В подготовленные чашки Петри разливали плотную питательную среду (МПА), после чего методом наслаивания наносили на поверхность среды готовые растворы фуранона по 100 мкл на чашку. Для того чтобы раствор впитался в среду, чашки оставляли при комнатной температуре на два часа. 4) Посев бактерий с жидкой среды на чашки с плотной средой и растворами фуранона. В качестве контроля – посев бактерий на плотную питательную среду без добавления веществ. Инкубация полученных образцов в термостате в течение 24 часов при температуре 37°C. 5) Визуальное наблюдение образования пигмента на плотных средах через 24 часа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно в тесте на токсичность были проверены все исследуемые производных фураноны. Было выяснено, что растворы фуранонов не проявили токсических эффектов в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл, в то время как фуранон №6 в концентрациях 1 и 10 мкг/мл привел к полному подавлению роста тестерного штамма *Salmonella typhimurium* TA100. Раствор фуранона №6 в концентрации 0,1 мкг/мл проявил значимое токсическое действие на штамм сальмонеллы, процент выживания штамма составил 50%, что позволяет исследовать эту концентрацию в тесте Эймса.

В тесте Эймса нами не обнаружены мутагенные эффекты исследуемых соединений в рабочем диапазоне концентраций, т.к. превышение числа ревертантов над контролем отсутствовало.

Далее были исследованы изменения в пигментообразовании грамположительных бактерий на примере *Streptomyces violaceoruber* и *Streptomyces nashvillensis* при добавлении в среду раствора фуранона в четырех концентрациях - от 0,1 до 100 мкг/мл.

Первоначально выращивали актинобактерии на жидкой среде при 30° в течение 3 суток. Далее растворы фуранона методом наслаивания наносили на поверхность плотной питательной среды в чашки Петри. По истечении двух часов осуществляли посев актинобактерий на плотную среду. Образцы инкубировали при 30° в течение 5 суток.

На 5 и 8 сутки роста культуры проводили визуальное наблюдение образования пигмента.

Интенсивность выделения пигмента оценивали по 5-балльной шкале.

Из результатов было видно, что фураноны способны как индуцировать, так и подавлять выделение пигмента. Так, в отношении *S. violaceoruber*, раствор фуранона №8 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл способен подавлять образование пигмента, а фураноны № 6 и 7 в концентрации 100 мкг/мл оказали индуцирующее влияние на пигментообразование. Фуранон №5 не вызвал изменений в образовании пигмента. В случае *S. nashvillensis*, растворы фуранонов под номерами 6 и 7 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл, снижали интенсивность образования и выделения пигмента. Все концентрации раствора фуранона №5 индуцировали пигментообразование. Фуранон №8 не оказал видимого влияния на выделение пигмента у данного стрептомицета.

Во всех случаях число КОЕ, выросших на чашках, существенных количественных различий не имело, что подтверждает отсутствие токсического воздействия на клетки *S. violaceoruber* и *S. nashvillensis*.

Было показано, что фуранон №6 в концентрации 1 мкг/мл усилил выделение пигмента, а фуранон №8 оказал ингибирующее воздействие на пигментообразование. Примеры влияния фуранонов на пигментообразование у *S. nashvillensis* показали, что концентрация 10 мкг/мл фуранона №5 в опытном образце вызвала более интенсивную окраску среды, чем в контроле. Фуранон № 6 в концентрации 100 мкг/мл подавил процесс образования пигмента относительно контрольного варианта.

Далее мы определяли изменение антибиотической активности штаммов *Streptomyces sp.* при действии исследуемых соединений. В качестве тест культур были использованы штаммы *Micrococcus lysodeiaticus* и *Serratia marcescens*.

Посев культур бактерий для теста на антибиотическую активность проводился на 7-е сутки роста актиномицетов. На 8-е сутки проводили замер диаметра зон задержки роста бактерий вокруг блоков с культурой стрептомицетов.

В ходе работы выяснили, что антибиотические вещества стрептомицетов активны только в отношении грамположительных бактерий, поэтому дальнейшие исследования проводили только с культурой *Micrococcus lysodeiaticus*.

Образцы фуранонов под номерами 6 и 8 не оказали существенного влияния на антибиотическую активность. Фуранон №5 оказал ингибирующее воздействие, однако

фуранон №7, напротив, способствовал повышению интенсивности выделения антибиотика у *S. violaceoruber*. Относительно *S. nashvillensis* фуранон №5 усилил выделение антибиотика, а фуранон №7 проявил себя в качестве ингибитора антибиотической активности. Полученные данные свидетельствуют о возможности влияния на интенсивность продукции и выделения антибиотических веществ стрептомицетами.

Таким образом, мы сделали следующие выводы:

1. Исследуемые производные фуранонов не проявили токсических эффектов в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 мкг/мл, в то время как фуранон № 6 в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл привел к полному подавлению роста тестерного штамма *Salmonella typhimurium TA100*. Нами не обнаружены мутагенные эффекты исследуемых соединений в рабочем диапазоне концентраций.

2. Определена видовая принадлежность актинобактерий *Streptomyces nashvillensis* и *Streptomyces violaceoruber*.

3. Показано, что, не оказывая токсического воздействия на клетки бактерий, фураноны способны как индуцировать, так и подавлять выделение пигмента. Так, например, в отношении *Serratia marcescens*, растворы фуранонов № 8 в рабочих концентрациях способны оказывать индуцирующее влияние на пигментообразование. Фуранон № 9 проявил себя в качестве ингибитора образования пигмента.

4. Результаты экспериментов показали, что все исследуемые растворы фуранонов выступают в качестве ингибиторов антибиотической активности у *S. violaceoruber*. Исключением является фуранон № 7, который, способствовал повышению интенсивности выделения антибиотика. Относительно *S. nashvillensis* фуранон № 5 способствовал интенсификации выделения антибиотика, а фураноны № 7, 9 и 12 проявили себя в качестве ингибиторов антибиотической активности.

5. Установлено, что производные фуранонов способны снижать устойчивость к антибиотикам у *Micrococcus lysodeiaticus* и *Serratia marcescens*, не оказывая на их клетки токсического или мутагенного воздействия. В частности, *M. lysodeiaticus* проявил наибольшую чувствительность к гентамицину при обработке среды растворами фуранонов № 5, 11 и 12. Обработка среды фуранонами № 5 и 9 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл также способствовала снижению устойчивости к гентамицину у *S. marcescens*.

Литература:

1. Гаузе, Г.Ф. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptovorticillium*, *Chainia* / Г.Ф. Гаузе, Т.П. Преображенская, М.А. Свешникова и др. М.: Наука. - 1983. - 248 с.
2. Гимадеева, Р.М. Цитотоксичность и генотоксичность новых производных фуранона / Р.М. Гимадеева, Э.В. Бабынин, А.Б. Маргулис [Текст] // "Вестник Уральской медицинской академической науки" (Тематический выпуск по микробиологии, иммунологии и биотехнологии). - 2011. - С. 26.
3. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров // учеб. для студентов биолог. спец. ун-тов. - М.: МГУ, Наука - 2004. - 528 с.
4. Калакуцкий, Л.В. Актиномицеты и растения / Л.В. Калакуцкий, Л.С. Шарая // Успехи микробиологии. - 1990. - Т.25. - С. 26-65.
5. Маргулис, А.Б. Влияние хлорпроизводных 2(5H)- фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток [Текст] / А.Б. Маргулис, А.Р. Курбангалиева, Н.В. Белоногова, Л.З. Латыпова, В.Я. Пономарев, Э.Н. Хакимуллина, Е.Ю. Трizza, М.И. Богачев, А.Р. Каюмов // Вестник Казанского технологического университета. - 2012. - Т.15. - С. 220-224.
6. Маргулис, А.Б. Методы генетической токсикологии / А.Б. Маргулис, Н.С. Карамова, О.Н. Ильинская // Учебно-методическое пособие. - Казань: КФУ, 2012. - 36 с.

7. Hentzer, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections [Text] / M. Hentzer, M. Givskov // J. Clin. Invest. - 2003. - V.112. - P. 1300-1307.
8. Hsueh, P. Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* Species [Text] / Po-Ren Hsueh, Tai-Fen Lee, Shin-Hei Du, Shih-Hua Teng, Chun-Hsing Liao, Wang-Hui Sheng, Lee-Jene Tenga // Journal of Clinical Microbiology. - 2014. - P. 2371-2379.
9. Manefield, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover [Text] / M. Manefield, T.B. Rasmussen, M. Hentzer, J.B. Anderson, P. Steinberg, S. Kjelleberg, M. Givskov // Microbiology. - 2002. - V.148. - P. 1119-1127.