

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП Д03680, Украина

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA*

Среди 94 штаммов 16 видов бактерий рода *Pseudomonas* проведено скрининг продуцентов веществ, активных по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*. Исследованные культуры были разделены на две группы. К первой группе отнесено большинство видов псевдомонад, которые выделяли киллерные факторы с низким и умеренным спектром активности. Среди лизатов этой группы наиболее выраженными антибактериальными свойствами характеризовались вещества штаммов *P. mendocina*, *P. fragi* и *P. taetrolens*, которые влияли на 30-50 % использованных индикаторных культур. Во вторую группу были включены исключительно бактерии вида *P. aeruginosa*, выделявшие киллерные факторы с более широким спектром активности. Среди всех исследованных псевдомонад максимальной активностью характеризовались лизаты 4 штаммов *P. aeruginosa*, влияющие более чем на 75 % использованных культур. Действующие вещества этих лизатов были предварительно отнесены к низкомолекулярным пиоцинам.

Ключевые слова: скрининг, бактерии рода *Pseudomonas*, низкомолекулярные пиоцины.

Значительное распространение мульти- и панрезистентных штаммов микроорганизмов существенно ограничивает возможности применения антибиотиков при терапии гнойно-воспалительных заболеваний. Особенно высокой устойчивостью к действию антимикробных средств характеризуются *Pseudomonas aeruginosa* [15]. Показано, что в лечебных учреждениях, особенно в отделениях интенсивной терапии, может выделяться до 8 % панрезистентных штаммов *P. aeruginosa* – стойких ко всем известным антибиотикам [11]. Это явление глобального распространения множественно резистентных штаммов приобретает угрожающие темпы и свидетельствует о необходимости поиска новых антимикробных средств, альтернативных антибиотикам [5]. Арсенал факторов бактериального антагонизма широко представлен различными высокоактивными веществами, одними из которых являются бактериоцины [4]. Последние характеризуются узкой специфичностью действия и высокой антибактериальной активностью, вследствие чего рассматриваются как возможная альтернатива традиционным антимикробным препаратам [8].

Поэтому целью нашей работы было проведение скрининга высокоактивных по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* веществ, выделяемых псевдомонадами.

Материалы и методы. Скрининг продуцентов осуществляли среди 94 штаммов 16 видов бактерий рода *Pseudomonas*, любезно предоставленных д-р биол. наук Е.А. Киприановой из Украинской коллекции микроорганизмов (Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины). Среди использованных микроорганизмов 41 штамм принадлежал к виду *P. aeruginosa*, 16 – к I-V биоварам *P. fluorescens*, 5 – к *P. aureofaciens*, по 4 штамма относились к видам *P. putida*, *P. stutzeri* и *P. mendocina*, по 3 – *P. alcaligenes*, *P. aurantiaca*, *P. fragi* и *Comamonas acidovorans* (ранее *Pseudomonas acidovorans*), по 2 представителя видов *P. chlororaphis* и *P. pseudoalcaligenes*, а также отдельные коллекционные штаммы *P. lundensis*, *P. denitrificans*, *P. taetrolens* и *Brevundimonas diminuta* (ранее *Pseudomonas diminuta*).

С целью получения антисинегнойных веществ в 18–24-х часовые культуры исследуемых штаммов вносили налидиксовую кислоту до конечной концентрации 20 мкг/мл. Суспензии инкубировали на протяжении 3-4 часов при 28°C в условиях интенсивной аэрации. Затем, в полученные суспензии добавляли хлороформ в соотношении 1:100 и повторно инкубировали 1-2 часа. Очистку лизатов от бактериального детрита осуществляли путем низкоскоростного центрифугирования на центрифуге Multi Spin MSC-3000 при 6 тыс. об/мин в течении 20-30 мин. Полученные супернатанты фильтровали через стерильные бумажные фильтры и хранили в плотно закрытых емкостях при 4-6°C, используя в качестве консерванта хлороформ.

Киллерную активность лизатов определяли методом «двухслойного агара». Для этого в расплавленный и охлажденный до 50-55°C полужидкий (0,7 %-ный) агар вносили культуру индикаторного штамма и наслаивали на плотную среду МПА в чашке Петри. На получен-

ный газон наносили по 5 мкл соответствующих лизатов и инкубировали 24 часа при 28°C. В качестве индикаторных культур использовали 18 коллекционных штаммов *P. aeruginosa* (УКМ). Образование зон лизиса оценивали как свидетельство наличия у исследуемых веществ киллерных свойств относительно *P. aeruginosa*. Спектр активности лизатов определяли по количеству чувствительных к ним индикаторных культур.

Природу выделенных киллерных веществ определяли с помощью ряда методов [3]. Для выявления в полученных лизатах бактериофагов, материал из образовавшихся зон лизиса переносили на свежие газоны индикаторных культур и наблюдали за появлением фаговых бляшек. Наличие в лизатах антибиотикоподобных веществ или токсичных продуктов бактериального метаболизма определяли путем нанесения исследуемых супернатантов на собственные культуры-продуценты. Принадлежность активных действующих компонентов к макромолекулярным или колициноподобным бактериоцинам определяли по их способности проникать через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 2,4 нм и вызывать лизис чувствительных индикаторных культур.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований было показано, что по спектру антимикробной активности лизаты бактерий рода *Pseudomonas* значительно отличаются между собой (табл. 1). При использованных условиях индукции 43 % штаммов не выделяли киллерных факторов, активных относительно *P. aeruginosa*. К неактивным были отнесены лизаты культур *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *Brevundimonas diminuta*. Среди остальных видов псевдомонад выявлено различное количество продуцентов антимикробных веществ. Так у *P. fluorescens* и *P. aureofaciens* киллерные факторы выделяли только единичные штаммы. Высокий процент активных лизатов обнаруживался у бактерий видов *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. aurantiaca*, *P. fragi*, *Comamonas acidovorans*. Необходимо отметить *P. fragi*, все использованные штаммы которых синтезировали вещества, высокоактивные к индикаторным культурам *P. aeruginosa*.

Таблица 1

Способность микроорганизмов рода *Pseudomonas* к выделению веществ, активных относительно *P. aeruginosa*

Вид исследованных микроорганизмов	Количество штаммов	
	использованные в исследованиях	продуценты активных веществ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41	36
<i>P. fluorescens</i>	16	4
<i>P. aureofaciens</i>	5	1
<i>P. putida</i>	4	0
<i>P. stutzeri</i>	4	0
<i>P. mendocina</i>	4	3
<i>P. alcaligenes</i>	3	0
<i>P. aurantiaca</i>	3	2
<i>P. fragi</i>	3	3
<i>Comamonas acidovorans</i>	3	2
<i>P. chlororaphis</i>	2	0
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	2	0
<i>P. lundensis</i>	1	1
<i>P. denitrificans</i>	1	1
<i>P. taetrolens</i>	1	1
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	0

В дальнейшем, полученные лизаты псевдомонад по спектру их антимикробных свойств разделили на несколько групп (табл. 2). Супернатанты, не влияющие ни на одну из использованных индикаторных культур обозначили как неактивные; вещества, вызывающие лизис менее 30 % штаммов – как низко активные; влияющие на 30-49 % культур – как умеренно активные, от 50 до 75 % – высоко активные. В случае чувствительности к киллерным факторам более 75 % индикаторных штаммов лизаты оценивали как максимально активные.

В группу низко активных продуцентов было отнесено 30 % от общего количества исследуемых штаммов псевдомонад (*P. fluorescens*, *P. lundensis*, *P. aureofaciens*, *P. denitrificans*, *C. acidovorans*, *P. aurantiaca*). Вещества, выделяемые данными микроорганизмами, харак-

теризовались довольно низкой активностью, поскольку влияли только на отдельные штаммы *P. aeruginosa*. Группа умеренно активных продуцентов была представлена наибольшим количеством штаммов, из которых значительная часть принадлежала виду *P. aeruginosa*. Из 49 представителей этой группы только семь относились к видам *P. mendocina*, *P. taetrolens* и *P. fragi*. Несмотря на одинаковый спектр антимикробной активности, киллерные факторы *P. aeruginosa*, по сравнению с веществами других видов псевдомонад, оказывали на индикаторные культуры более выраженное влияние. Это проявлялось существенными отличиями в размере и степени прозрачности образованных зон лизиса (рис. 1). Данное явление обусловлено, очевидно, более близким филогенетическим родством к индикаторным штаммам *P. aeruginosa* киллерных частиц того же вида, нежели веществ *P. mendocina*, *P. taetrolens* или *P. fragi*.

Таблица 2

Активность лизатов бактерий рода *Pseudomonas* к индикаторным микроорганизмам *P. aeruginosa*

Штаммы-продуценты*		Количество чувствительных индикаторных штаммов, %	Группы лизатов по активности
видовая принадлежность	количество штаммов		
<i>P. chlororaphis</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i> , <i>P. stutzeri</i> , <i>B. diminuta</i>	16	0	I неактивные
<i>P. fluorescens</i> , <i>P. lundensis</i> , <i>P. aureofaciens</i> , <i>P. denitrificans</i> , <i>C. acidovorans</i> , <i>P. aurantiaca</i>	29	3-29	II низко активные
<i>P. mendocina</i> , <i>P. fragi</i> , <i>P. taetrolens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	49	30-49	III умеренно активные

Примечание: * - здесь и в табл. 3 лизаты наведены в порядке возрастания спектра их антибактериальной активности.

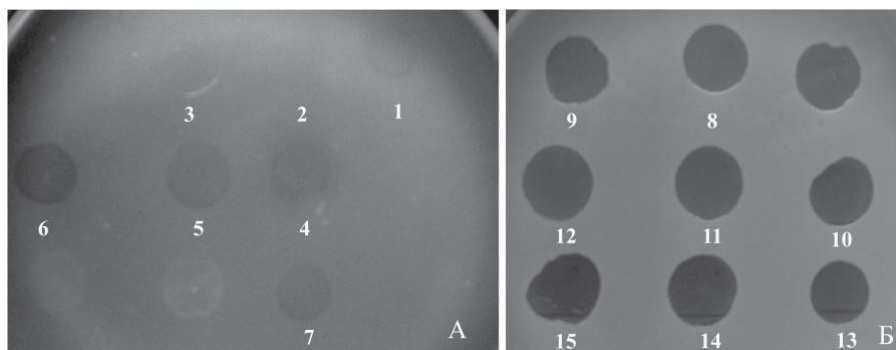


Рис. 1. Негативные зоны лизиса умеренно активных лизатов бактерий рода *Pseudomonas* на индикаторной культуре *P. aeruginosa* УКМ В-2. А – действие веществ из *P. mendocina* (1-3), *P. fragi* (4-6) и *P. taetrolens* (7); Б – влияние лизатов *P. aeruginosa* (PAE): PAE-5 (8), PAE-6 (9), PAE-8 (10), PAE-14 (11), PAE-19 (12), PAE-21 (13), PAE-22 (14) и PAE-24 (15).

В связи с широким спектром и высокой степенью активности в дальнейших исследованиях использовали вещества *P. aeruginosa*. Было показано, что указанные киллерные факторы характеризуются выраженными антимикробными свойствами относительно представителей того же вида (табл. 3). Среди изучаемых лизатов только 12 % были неактивными, 54 % – низко и умеренно активными, тогда как 34 % характеризовались высокой и максимальной активностью. Последние получены из 14 штаммов, среди которых десять продуцентов выделяли вещества, влияющие на большую часть индикаторных культур, а четыре – практически на все использованные штаммы *P. aeruginosa*. Лизат V группы, например PAE-24, характеризовался активностью относительно 16, а PAE-22 был активным к 17 из 18 использованных индикаторных культур. Киллерные факторы микроорганизмов IV группы *P. aeruginosa* отличались более узким спектром активности. Так, вещества лизата PAE-14 угнетали рост 13 штаммов, а лизатов PAE-5, PAE-8 и PAE-41 – 12 из 18 использованных культур *P. aeruginosa*. Тем не менее, все 14 штаммов были отобраны для дальнейших исследований в качестве продуцентов высокоактивных веществ.

Активность лизатов штаммов *P. aeruginosa* к индикаторным микроорганизмам

Лизаты <i>P. aeruginosa</i> (PAE)	Количество чувствительных индикаторных штаммов, %	Группы лизатов по активности
PAE-2; PAE-3; PAE-4; PAE-7; PAE-39	0	I неактивные
PAE-28; PAE-20; PAE-18; PAE-36; PAE-37; PAE-35; PAE-30; PAE-32	6-29	II низко активные
PAE-17; PAE-15; PAE-33; PAE-13; PAE-26; PAE-25; PAE-40; PAE-11; PAE-34; PAE-16; PAE-23; PAE-27; PAE-9; PAE-31	30-49	III умеренно активные
PAE-1; PAE-10; PAE-19; PAE-21; PAE-12; PAE-29; PAE-5; PAE-8; PAE-41; PAE-14	50-74	IV высоко активные
PAE-38; PAE-6; PAE-24; PAE-22	75-90	V максимально активные

На последующем этапе проводили изучение природы активных действующих компонентов отобранных лизатов. Было показано, что вещества 11 из 14 штаммов не переносились из сформированных ими зон лизиса на чистой газон индикаторной культуры, не влияли на собственные культуры-продуценты и проникали через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 2,4 нм. Исходя из этого, исследованные киллерные факторы были предварительно отнесены к низкомолекулярным пиоцинам. Действующие компоненты трех других лизатов обладали несколько иными свойствами. При этом, вещества лизата PAE-12 рассматривали как аналоги антибиотиков, а лизатов PAE-10 и PAE-29 – как высокомолекулярные пиоцины и бактериофаги, соответственно.

Выделение и изучение свойств бактериоциноподобных веществ бактерий рода *Pseudomonas* проводились как отечественными [3], так и зарубежными учеными [6, 7, 12, 13]. Следует отметить фундаментальные исследования Смирнова В.В., Киприановой Е.А., Гарагули А.Д. и др. [3], а также Додатко Т.А. [1], которыми было показано выделение бактериоцинов рядом микроорганизмов флюоресцирующих и нефлюоресцирующих групп псевдомонад. Глубокое изучение явления бактериоциногенности проведено и для некоторых фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* [14]. Образование лектинподобных бактериоцинов с нетипичными свойствами показано для *P. fluorescens* Pf-5 [13]; веществ, сходных с пиоцинами S типа – у *P. syringae* pv. *syringae* [7] и *P. solanacearum* [6]; путидацинов – у ризосферных изолятов *Pseudomonas* sp. BW11M1 [12]. Таким образом, описанными являются бактериоцины лишь некоторых видов псевдомонад, тогда как согласно последним данным род *Pseudomonas* насчитывает более 130 видов. Учитывая возможность 99 % всех известных микроорганизмов синтезировать, по крайней мере, хотя бы один тип антибактериальных веществ [9] можно предположить, что многие киллерные факторы бактерий этого рода остаются еще не исследованными. Кроме того, в большинстве проведенных в этом направлении работ основное внимание уделяется, преимущественно, тщательному изучению отдельных свойств бактериоциноподобных веществ тех или иных псевдомонад. В проведенных нами исследованиях цель работы была несколько иная – выделить, сравнить между собой и отобрать вещества, наиболее активные по отношению к одному, клинически значимому виду микроорганизмов. Такой подход был призван максимально приблизить фундаментальные исследования к решению важных практических задач. Использование низкомолекулярных пиоцинов для влияния на множественно устойчивые клинические изоляты *P. aeruginosa* рассматривается также некоторыми другими авторами как один из возможных путей решения проблемы антибиотикорезистентности указанных микроорганизмов [8, 10]. Тем не менее, с целью предупреждения возникновения возможных побочных эффектов от бактериоциноотерапии [2], арсенал средств влияния, по нашему мнению, должен быть максимально широким для возможности выбора из известных веществ наиболее оптимальных и безопасных аналогов.

Бактерии рода *Pseudomonas* выделяют вещества, существенно отличающиеся по спектру антибактериальной активности относительно *P. aeruginosa*. На основании указанного критерия исследованные микроорганизмы были разделены на две группы. К первой группе отнесено большинство исследованных видов псевдомонад, продуцирующие киллерные факторы низкого и умеренного спектра активности. Среди представителей этой группы наиболее высокими показателями характеризовались лизаты *P. mendocina*, *P. fragi* и *P. taetrolens*. Вторая группа была представлена исключительно бактериями вида *P. aeruginosa*, способными выделять вещества с более широкой антибактериальной активностью по отношению к близкородственным штаммам. Наивысшими показателями характеризовались лизаты 14 штаммов *P. aeruginosa*, действующие компоненты у 11 из которых предварительно отнесены к низкомолекулярным пиоцинам. Максимально широкий спектр антибактериальной активности относительно *P. aeruginosa* выявлялся у лизатов PAE-38; PAE-6; PAE-24; PAE-22, что позволяет рассматривать исследуемые вещества как перспективные для дальнейших исследований.

О.Б. Балко, Л.В. Авдеева

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна*

СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ БАКТЕРІОЦИНОПОДІБНИХ РЕЧОВИН, АКТИВНИХ ЩОДО *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме

Серед 94 штамів 16 видів бактерій роду *Pseudomonas* проведено скринінг продуцентів речовин, активних щодо *Pseudomonas aeruginosa*. Досліджені культури було поділено на дві групи. До першої групи віднесено більшість досліджуваних видів псевдомонад, які характеризувались виділенням кілерних факторів із низьким та помірним спектром активності. Серед лізатів даної групи найбільш вираженими антибактеріальними властивостями характеризувались речовини штамів *P. mendocina*, *P. fragi* і *P. taetrolens*, які впливали на 30-50 % використаних індикаторних культур. До другої групи належали виключно бактерії виду *P. aeruginosa*, здатні виділяти кілерні фактори із значно ширшим спектром активності. Серед всіх досліджених псевдомонад максимальною активністю характеризувались лізати 4 штамів *P. aeruginosa*, які впливали більш ніж на 75 % досліджених культур. Діючі компоненти вказаних лізатів були попередньо віднесені до низькомолекулярних піоцинів.

Ключові слова: скринінг, бактерії роду *Pseudomonas*, низькомолекулярні піоцини.

A.B. Balko, L.V. Avdeeva

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

SCREENING OF PRODUCERS OF BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCES ACTIVE AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

S u m m a r y

The strains (n=94) of 16 *Pseudomonas* species have been screened for producers of substances active against *Pseudomonas aeruginosa*. Investigated cultures were divided into two groups. The majority of *Pseudomonas* species have been included in the first group. These species were able to produce substances with low and medium activity spectrum. In the first group *P. mendocina*, *P. fragi* and *P. taetrolens* lysates were the most active and influenced 30-50% of indicator cultures. Only *P. aeruginosa* strains belong to the second group. The microorganisms of this group were able to produce substances with considerably higher activity spectrum. Among all investigated pseudomonades four *P. aeruginosa* strain lysates possessed the highest activity and were active against more than 75% of used cultures. It was shown that the main active killer components of these lysates belonged to low-weight pyocins.

The paper is presented in Russian.

Key words: screening, *Pseudomonas*, low-weight pyocins.

The author's address: Balko A.B., Avdeeva L.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Додатко Т.А.* Антагонистические свойства и антибиотические вещества *Pseudomonas cepacia*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1990. – 19 с.

2. Крылов В.Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, ограничения // Генетика. – 2001. – **37**, № 7. – С. 869–887.
3. Смирнов В.В., Киприанова Е.А., Гарагуля А.Д., Рубан В.И., Додатко Т.А. Бактериоцины некоторых видов рода *Pseudomonas* // Антибиотики. – 1984. – **29**, № 10. – С. 730-735.
4. Annabel H.A., De Mot P., De Mot R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of *Pseudomonas* and other γ -proteobacteria // Trends in Microbiol. – 2002. – **10**, N 3. – P. 107-112.
5. Calvin M., Kunin C.M. Resistance to antimicrobial drugs—a worldwide calamity // Ann. Intern. Med. – 1993. – **118**, N 7. – P. 557–561.
6. Cuppels D.A., Hanson R.S., Kelman A. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum* // J. Gen. Microbiol. – 1978. – **109**. – P. 295-303.
7. Feil H., Feil W.S., Chain P., Larimer F., DiBartolo G., Copeland A., Lykidis A., Trong S., Nolan M., Goltsman E., Thiel J., Malfatti S., Loper J.E., Lapidus A., Detter J.C., Land M., Richardson P.M., Kyrpides N.C., Ivanova N., Lindow S.E. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – **102**, N 31. – P. 11064–11069.
8. Gillor O., Nigro L. M., Riley M. A. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials // Curr. Pharm. Des. – 2005. – **11**, № 8. – P. 1067 – 1075.
9. Kalmokoff M.L., Bartlett F., Teather R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? // J. Dairy Sci. – 1996. – **79**, N 12. – P. 2297 – 2306.
10. Ling H., Saeidi N., Rasouliha B.H., Chang M.W. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage // FEBS Lett. – 2010. – **584**, N 15. – P. 3354-3358.
11. Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium // Clin. Microbiol. Infect. – 2007. – **13**, N 6. – P. 560-578.
12. Parret A.H., Schoofs G, Proost P., DeMot R. Plant lectinlike bacteriocin from a rhizosphere-colonizing *Pseudomonas* isolate // J. Bacteriol. – 2003. – **185**, N 3. – P. 897–908.
13. Parret A.H., Temmerman K., De Mot R. Novel lectin-like bacteriocins of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – **71**, N 9. – P. 5197–5207.
14. Vidaver A.K., Mathys M.L., Thomas M.E., Schuster M.L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolicola* // Can. J. Microbiol. – 1972. – **18**, N. 6. – P. 705-713.
15. Wang C.Y., Jerng J.S., Cheng K.Y., Lee L.N., Yu C.J., Hsueh P.R., Yang P.C. Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes // Clin. Microbiol. Infect. – 2006. – **12**, N 1. – P. 63-68.

Отримано 23.03.2011