

А.Б. Балко, В.В. Видасов, Л.В. Авдеева

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

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИНДУКЦИИ БАКТЕРИОЦИНОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Исследовано влияние условий культивирования штамма-продуцента бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333 на активность выделяемых киллерных частиц. Показано, что индукция бактериоцинов происходит с максимальной активностью на среде LB при 28 °С и внесении в качестве индуктора 100 мкг/мл налидиксовой кислоты в позднюю логарифмическую фазу роста культуры. Использование предложенных методов оптимизации индукции позволяет повысить активность бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 в 256 раз и достичь при этом 6,5 млн ЕА/мл.*

*Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, бактериоцины, оптимизация индукции.*

Широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, в т.ч. среди *Pseudomonas aeruginosa* [8] обуславливает необходимость поиска альтернативных веществ с антимикробной активностью [7]. Существенный интерес вызывает возможность использования с подобной целью бактериоцинов, которые являются одними из наиболее распространенных киллерных частиц, выделяемых микроорганизмами для конкурентного антагонизма близкородственных видов [11]. Широкое распространение бактериоциногении, высокая антибиотическая активность и узкий спектр действия обеспечивают значительный потенциал использования бактериоцинов для избирательного влияния на мультирезистентные штаммы микроорганизмов [5].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что среди бактерии рода *Pseudomonas* выявляется значительное количество бактериоциногенных штаммов [2]. При этом некоторые культуры псевдомонад выделяли вещества, способные подавлять рост 75-90 % штаммов того же вида. В результате проведенной работы из общего количества полученных лизатов было отобрано 11 с наиболее широким спектром действия, которые представляли интерес для дальнейших исследований [1]. Тем не менее, в связи с невысоким содержанием киллерных частиц данные лизаты характеризовались относительно низкими показателями активности, что затрудняло проведение их разностороннего изучения.

Поэтому, целью работы было повышение эффективности индукции бактериоцинов *P. aeruginosa* путем подбора условий культивирования штамма-продуцента.

Материалы и методы. *Объектом исследования служил коллекционный штамм *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333, один из высокоактивных продуцентов киллерных частиц. Активность бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 на разных этапах исследования определяли по отношению к двум индикаторным культурам *P. aeruginosa* (штаммы УКМ В-3 и УКМ В-10). Используемые в работе штаммы были получены из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ) отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.*

В исследованиях применяли методику индукции, описанную нами ранее [2]. В суспензию культуры-продуцента, находящейся в логарифмической фазе роста, в качестве индуктора вносили налидиксовую кислоту до конечной концентрации 20 мкг/мл, инкубировали 3-4 часа, процесс индукции останавливали путем внесения хлороформа. Лизаты очищали от бактериального детрита с помощью низкоскоростного центрифугирования и получали супернатант, содержащий бактериоцины.

Активность полученных киллерных частиц определяли методом «двухслойного агара» [3]. Для этого в расплавленный и охлажденный до 50-55 °С полужидкий

(0,7 %-ный) агар (ПЖА) вносили бактериальную суспензию индикаторной культуры *P. aeruginosa* УКМ В-3 или УКМ В-10. Затем ПЖА наслаивали на плотную среду МПА в чашке Петри и после застывания на поверхность наносили по 5 мкл исследуемых лизатов *P. aeruginosa* УКМ В-333. Образование зон лизиса расценивали как свидетельство о наличии у полученных веществ киллерных свойств относительно использованной индикаторной культуры.

Количественные показатели активности лизатов определяли описанным выше методом «двухслойного агара», дополненным методом серийных двукратных разведений. Для каждого исследуемого супернатанта получали ряд разведений (в пределах от 2 до 4096 раз и более), из которых отбирали по 5 мкл и наносили на полученный газон с индикаторной культурой. Активность веществ определяли по максимальному разведению, способному вызывать образование зон лизиса. Полученные результаты пересчитывали на 1 мл исследуемого лизата и выражали в единицах активности – ЕА (в тысячах или миллионах) /мл [12].

Влияние условий культивирования на оптимизацию индукции бактериоцинов и, соответственно, активность полученных лизатов изучали поэтапно. Наиболее оптимальные из исследованных условий применяли в дальнейших опытах. Зависимость активности лизатов от температурного режима определяли путем культивирования бактериальной суспензии в условиях интенсивной аэрации при разных температурах (20, 28 и 37 °С). Влияние фазы роста культуры-продуцента на уровень индукции бактериоцинов оценивали путем разведения суточной культуры микроорганизмов с МПБ в разных соотношениях (1:10, 1:20, 1:50). Полученные суспензии инкубировали 1-5 ч, отбирали аликвоты (по 100 мкл) для определения количества микроорганизмов, после чего вносили индуктор. По количеству микроорганизмов делали вывод о достижении культурой соответствующей фазы роста. Определение количества индуктора, необходимого для получения максимально активных лизатов, проводили посредством добавления к бактериальным суспензиям налидиксовой кислоты до разных конечных концентраций – 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкг/мл. Достигнутую активность лизатов сравнивали с уровнем их спонтанной индукции, который устанавливали путем внесения в бактериальную суспензию вместо индуктора соответствующего объема 0,9 %-ного раствора NaCl. В работе также изучали влияние инкубирования штамма-продуцента на разных питательных средах (LB, МПБ, тиогликолевая, Мюллера-Хинтона, Козера с 0,1 % глюкозы) на активность лизатов.

Одновременно с получением активных лизатов определяли количество микроорганизмов в бактериальных суспензиях. Для этого каждый час в течение периода наблюдения из культуральной жидкости отбирали по 100 мкл и аликвоты (10 мкл) последовательных десятикратных разведений наносили на чашки с МПА. Таким образом определяли количество КОЕ (колониеобразующих единиц) бактерий-продуцентов в 1 мл, строили графики и логарифмическим методом рассчитывали время удвоения бактериальной культуры [4].

Результаты и их обсуждение. Изучение влияния температурного режима на индукцию бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 показало, что активность киллерных частиц, полученных культивированием при 37 °С, оказалась наиболее низкой. В отношении индикаторной культуры *P. aeruginosa* УКМ В-3 этот показатель составлял 25,6 тыс. ЕА/мл, а для УКМ В-10 – 102,4 тыс. ЕА/мл (рис. 1). Инкубирование при 20 °С повышало активность лизатов в 4 раза только к штамму УКМ В-3. Наиболее эффективным для индукции оказалось использование температурного режима 28 °С, поскольку полученные при этих условиях бактериоцины проявляли максимальную активность – 102,4 тыс. ЕА/мл по отношению к УКМ В-3 и 204,8 тыс. ЕА/мл – к УКМ В-10.

Было показано, что под влиянием индуктора (налидиксовой кислоты) выделение киллерных частиц происходит во всех фазах роста культуры *P. aeruginosa* УКМ В-333 (рис. 2). Тем не менее, при добавлении налидиксовой кислоты в лаг-фазе и на начальном этапе экспоненциальной фазы выделялись вещества с более низ-

кой активностью. Так, показатели активности полученных в эти периоды лизатов по отношению к индикаторному штамму УКМ В-3 колебались в диапазоне 12,8 – 25,6 тыс. ЕА/мл, а к УКМ В-10 – постепенно увеличивались от 102,4 до 204,8 тыс. ЕА/мл по мере роста культуры-продуцента. Достижение максимальных результатов было отмечено при внесении налидиксовой кислоты в позднюю экспоненциальную фазу. При этом активность лизатов УКМ В-333 по отношению к штаммам УКМ В-10 и УКМ В-3 возрастала в 8 и 16 раз, соответственно.

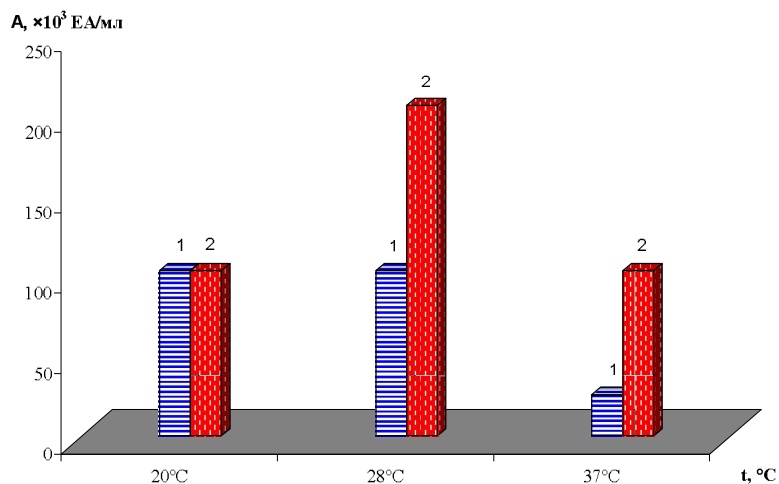


Рис. 1. Активность (А) индуцированных бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333 в зависимости от температуры культивирования штамма-продуцента.

Примечание. Здесь и далее на рис. 2-4 активность определяли по отношению к индикаторным культурам: 1 – *P. aeruginosa* УКМ В-3; 2 – *P. aeruginosa* УКМ В-10. ЕА – единицы активности. Высота столбика показывает активность бактериоцинов штамма-продуцента, определенную по максимальному разведению лизата, способному вызывать образование зон лизиса индикаторной культуры.

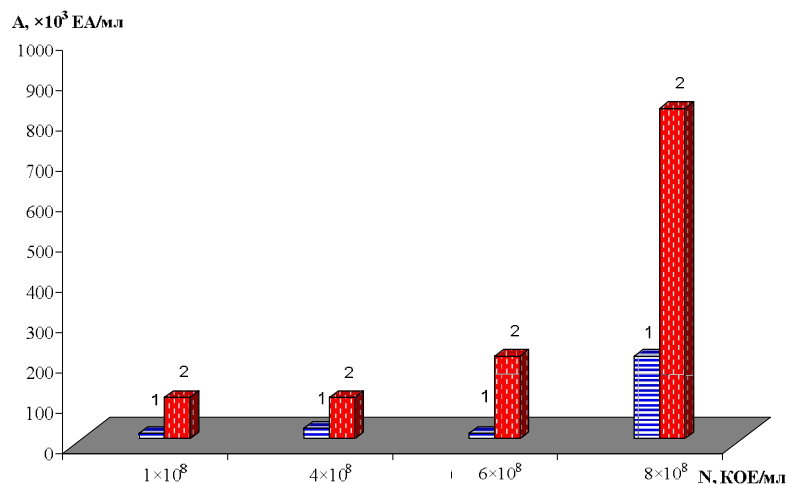


Рис. 2. Активность (А) бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333, индуцированных внесением налидиксовой кислоты в разные фазы роста культуры-продуцента. Количество микроорганизмов (N) в бактериальной суспензии 1×10^8 КОЕ/мл соответствует лаг-фазе, а $4-8 \times 10^8$ КОЕ/мл – разным стадиям экспоненциальной фазы роста штамма-продуцента. КОЕ – колониеобразующие единицы. Остальные обозначения см. рис. 1.

Одним из наиболее существенных факторов для индукции бактериоцинов очевидно следует рассматривать концентрацию вносимого индуктора (налидиксовой кислоты). Было показано, что уровень спонтанного выделения киллерных частиц *P. aeruginosa* УКМ В-333 является довольно низким, поскольку активность лизатов по отношению к индикаторным штаммам УКМ В-3 и УКМ В-10 составляла 1,6 и 51,2 тыс. ЕА/мл, соответственно (рис. 3). Необходимо отметить, что внесение налидиксовой кислоты до конечной концентрации 10 мкг/мл практически не влияло на индукцию бактериоцинов. Начало индуцибельного эффекта наблюдалось только при внесении в суспензию налидиксовой кислоты до 20 мкг/мл и сопровождалось повышением активности киллерных частиц соответственно до 51,2 и 204,8 тыс. ЕА/мл. Дальнейшее увеличение концентрации индуктора сопровождалось линейным возрастанием активности выделяемых бактериоцинов. Максимальные показатели активности лизатов были отмечены при 100 мкг/мл налидиксовой кислоты. В этом случае активность киллерных частиц по отношению к УКМ В-10 и УКМ В-3 возросла в 16 и 256 раз, по сравнению с таковой при их спонтанном выделении. Внесение индуктора в большем количестве оказалось нецелесообразным, поскольку уже при концентрации 200 мкг/мл показатели активности бактериоцинов резко снижались и колебались в диапазоне 12,8-25,6 ЕА/мл по отношению к обеим индикаторным культурам.

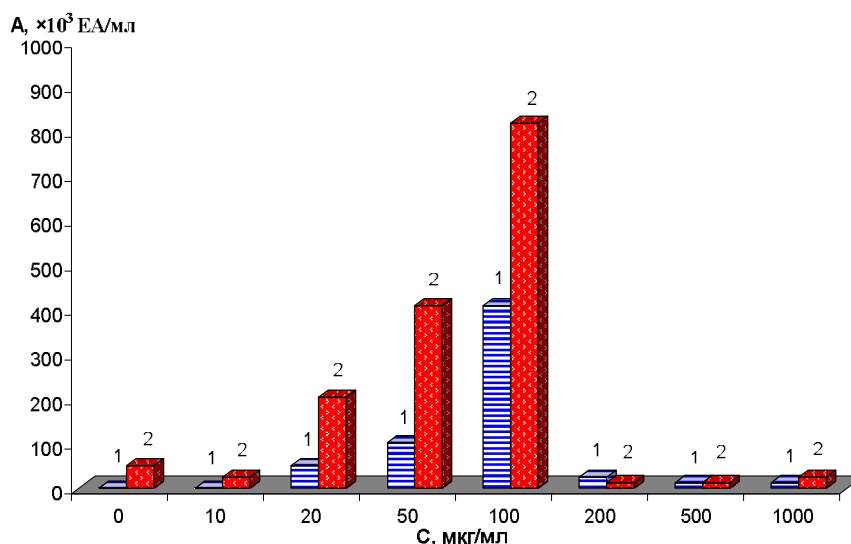


Рис. 3. Активность (А) бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333, индуцированных внесением налидиксовой кислоты до разных конечных концентраций (С). Остальные обозначения см. рис. 1.

При выращивании культуры-продуцента на разных питательных средах было показано, что использование минимальной среды Козера с добавлением 0,1 % глюкозы не способствует выделению высокоактивных бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 (рис. 4). В этом случае активность полученных киллерных частиц по отношению к использованным индикаторным культурам была в 8 и 16 раз ниже даже по сравнению с уровнем их спонтанной индукции. Культивирование на тиогликолевой среде, Мюллера-Хинтона и МПБ характеризовалось приблизительно одинаковым и достаточно высоким уровнем индукции бактериоцинов. При этом активность полученных на среде Мюллера-Хинтона лизатов была все же несколько ниже и по отношению к УКМ В-3 составляла 25,6 тыс. ЕА/мл, а к УКМ В-10 – 409,6 тыс. ЕА/мл. При инкубировании продуцента на тиогликолевой среде и МПБ показатели индукции практически совпадали и превышали таковые, полученные на среде Мюллера-Хинтона, в 8 и 2 раза по отношению к УКМ В-3 и УКМ В-10, соответственно.

Наивысшая активность бактериоцинов была достигнута при культивировании *P. aeruginosa* УКМ В-333 на среде LB. Полученные в этом случае киллерные частицы в отношении УКМ В-10 обладали активностью 6,5 млн ЕА/мл, которая превышала показатели на тиогликолевой среде в 8 раз. Таким образом, подбор условий культивирования *P. aeruginosa* УКМ В-333 позволил существенно оптимизировать индукцию бактериоцинов, что проявилось значительным повышением показателей их активности.

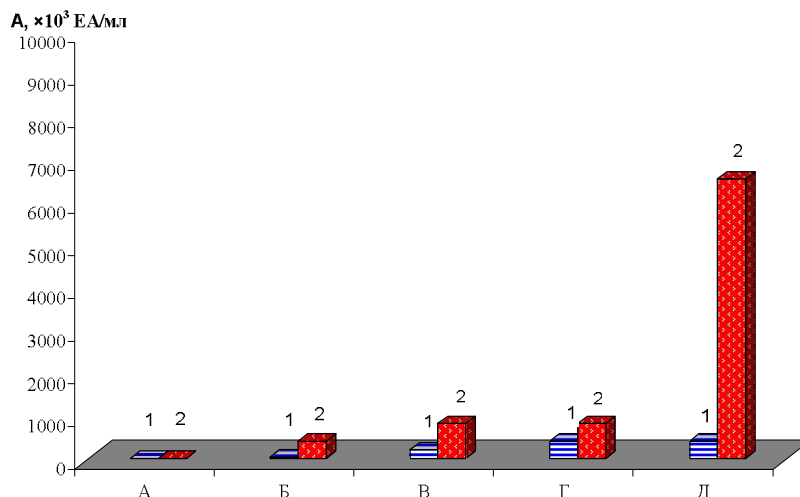


Рис. 4. Активность (А) бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333, индуцированных при выращивании культуры-продуцента на разных средах: А – Козера с 0,1% глюкозы, Б – Мюллера-Хинтона, В – МПБ, Г – тиогликолевая среда, Д – LB. Остальные обозначения см. рис. 1

Предложенная методика оказалась эффективной для индукции киллерных частиц и других штаммов *P. aeruginosa*. К примеру, активность полученного при указанных условиях лизата *P. aeruginosa* PAO-8 составила 1,6 млн ЕА/мл, лизатов PAO-19 и PAO-24 – 3,2 млн ЕА/мл, а у лизата PAO-41 достигла 26,2 млн ЕА/мл.

Выделение бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 наблюдалось при всех использованных условиях инкубирования. Тем не менее, более высокие показатели активности лизатов были получены при культивировании продуцента при 28 °С. Согласно графику роста культуры показано, что удвоение численности популяции *P. aeruginosa* УКМ В-333 при 28 °С составляло 55 мин, а при 37 °С – 75 мин. Следовательно, на момент внесения индуктора при 28 °С накапливалось большее количество биомассы, нежели при 37 °С. Более активный рост и индукция бактериоцинов при 28 °С может быть обусловлено выделением штамма-продуцента из внешней среды. Подобная закономерность была показана при индукции пиоцинов из почвенного изолята *P. aeruginosa* Pa [13]. В указанной работе максимум активности наблюдали при 32 °С, тогда как при 37 °С соответствующие показатели оказались значительно ниже. Другие авторы отмечали более интенсивное образование пиоцинов при 35-37 °С, что связывалось с их выделением из клинических изолятов человека [6].

В проведенных исследованиях показано, что более высокая активность лизатов отмечалась при индукции киллерных частиц в поздней логарифмической фазе роста культуры продуцента. Также отмечено, что интенсивность выделения бактериоцинов преобладает при использовании для культивирования богатых питательных сред. На минимальной среде Козера показатели активности лизатов оказались ниже даже уровня спонтанной индукции, что дополнительно свидетельствует о значимости оптимизации условий культивирования для интенсификации процесса индукции. Выделение пиоцинов на протяжении всех фаз роста культуры с возрастанием их

активности при обогащении состава среды и достижении культурой продуцента стационарной фазы роста также отмечено другими исследователями [13, 14].

В работе показано, что на выделение бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 существенное влияние оказывает количество вносимого индуктора. Можно отметить, что добавление налидиксовой кислоты до 10 мкг/мл не изменяет показателей активности лизатов, при 100 мкг/мл – наблюдается максимальное выделение киллерных частиц, тогда как последующее двукратное повышение концентрации индуктора приводит к резкому падению соответствующих показателей. Описанная закономерность указывает на повреждающее действие налидиксовой кислоты на ДНК культуры продуцента и активацию SOS системы клетки хозяина, которая запускает процесс выделения бактериоцинов [9]. Наличие SOS-зависимой системы индукции киллерных частиц типично для низко- и высокомолекулярных бактериоцинов, но не характерно для микроцинов [10]. Последние интенсивно синтезируются при голодании бактериальной культуры [10], тогда как в нашем случае активность веществ возрастает с обогащением состава среды. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод об отсутствии микроцинов в составе полученных нами лизатов.

Таким образом, в проведенной нами работе было показано, что индукция бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 происходит с максимальной активностью на поздних стадиях роста культуры в обогащенной питательной среде. Оптимальные условия для получения киллерных частиц достигаются при культивировании продуцента на среде LB при 28 °С и внесении в качестве индуктора 100 мкг/мл налидиксовой кислоты в позднюю логарифмическую фазу роста. Использование предложенных методов оптимизации индукции позволяет повысить активность бактериоцинов *P. aeruginosa* УКМ В-333 в 256 раз и достичь при этом 6,5 млн ЕА/мл.

Бактериоцины *P. aeruginosa* УКМ В-333 обладали типичными для отобранных ранее лизатов свойствами [1], что позволяет экстраполировать полученные результаты оптимизации индукции на другие культуры-продуценты киллерных частиц подобного типа.

О.Б. Балко, В.В. Видасов, Л.В. Авдеева

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ІНДУКЦІЇ БАКТЕРІОЦІНІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме

Досліджено вплив умов культивування штаму-продуцента бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333 на активність утворених килерних часток. Показано, що індукція бактеріоцинів відбувається із максимальною активністю на середовищі LB при 28 °С і внесенні у якості індуктора 100 мкг/мл налидиксової кислоти в пізню логарифмічну фазу росту культури. Використання запропонованих методів оптимізації індукції дозволяє підвищити активність бактеріоцинів *P. aeruginosa* УКМ В-333 в 256 разів і досягнути при цьому показника 6,5 млн ОА/мл.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, бактеріоцини, оптимізація індукції.

A.B. Balko, V.V. Vidasov, L.V. Avdeeva

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

OPTIMIZATION OF CONDITIONS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOCIN INDUCTION

Summary

Influence of cultivation conditions on activity of bacteriocins produced by *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-333 has been investigated. It was shown, that the induction of bacteriocins with maxi-

imum activity values occurs on LB medium at 28 °C after addition of 100 µg/ml of nalidixic acid in a late logarithmic growth phase. Using the proposed methods for induction optimization permits to improve activity of *P. aeruginosa* УКМ В-333 bacteriocins 256 times and to reach the index of 6.5 million AU/ml.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Pseudomonas aeruginosa*, bacteriocin, optimisation of induction.

The authors' address: *Balko A.B.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Балко А.Б., Авдеева Л.В.* Антисинегнойная активность бактериоциноподобных веществ бактерий рода *Pseudomonas* // Биология– наука XXI века: Материалы 15-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых (18 – 22 апреля 2011 г.). – Пущино, Россия, 2011. – С. 193–194.
2. *Балко А.Б., Авдеева Л.В.* Скрининг продуцентов бактериоциноподобных веществ, активных по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, № 2. – С. 8–13.
3. *Товкач Ф.И., Балко А.Б., Муквич Н.С.* Особенности лизогенной индукции бактериоцинов у тиминового мутанта *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – **68**, № 3. – 2006. – С. 33–46.
4. Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.
5. *Gillor O., Etzion A., Riley M.A.* The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – **81**, N 4. – P. 591–606.
6. *Iwalokun B.A., Akinsinde K.A., Lanlenhin O., Omubogu C.C.* Bacteriocinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas* species isolated in Lagos, Nigeria. African // J. Biotechnol. – 2006. – **5**, N 1. – P. 1072–1077.
7. *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.
8. *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.
9. *Michel-Briand Y., Baysse C.* The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* // Biochimie. – 2002. – **84**, N 5. – P. 499–510.
10. *Moreno F., San Millan J.L., Hernández-Chico C., Kolter R.* Microcins // Biotechnol. Ser. – 1995. – **28**, N 1. – P. 307–321.
11. *Riley M.A., Chavan M.* Bacteriocins: ecology and evolution. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. – 154 p.
12. *Saeed S., Rasool A.J., Ahmed S., Khanum T., Khan M.B., Abbasi A., Ali S.A.* New insight in Staphylococci research: Bacteriocin and/or BLIS produced by *S. aureus* AB188 // W.J. Microbial. Biotech. – 2006. – **22**, N 7. – P. 713–722.
13. *Saleem F., Ahmad S., Yaqoob Z., Rasool S.A.* Comparative study of two bacteriocins produced by representative indigenous soil bacteria // Pak. J. Pharm. Sci. – 2009. – **22**, N 3. – P. 252–258.
14. *Vignolo G.M., de Kairuz M.N., de Ruiz Holgado A.A.P., Oliver G.* Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705 // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – **78**, N 1. – P. 5–10.

Отримано 10.10.2011