

На правах рукописи



ПЛЮТА ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК И QUORUM SENSING
РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва–2014

Работа выполнена на кафедре биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева (РХТУ им. Д.И. Менделеева), г. Москва и в лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук (ФГБУН ИМГ РАН), г. Москва.

Научные руководители: **Хмель Инесса Александровна,**
доктор биологических наук, профессор, заведующая
Лабораторией регуляции экспрессии генов микроорганизмов
ФГБУН ИМГ РАН

Кузнецов Александр Евгеньевич,
кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии
РХТУ им. Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты: **Плакунов Владимир Константинович,**
доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт
микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, главный
научный сотрудник

Манухов Илья Владимирович,
доктор биологических наук, ФГУП «Государственный
научно-исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов», ведущий научный
сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технический университет имени А.Н. Туполева»

Защита состоится «24» февраля 2015 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

Тел. 8 (495) 939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 201__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследования последнего десятилетия показали, что большинство бактерий (более 99 %) существует в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к субстратам биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс.

Изучение биопленок вызывает огромный интерес исследователей; он связан, прежде всего, с тем, что способность патогенных бактерий существовать в составе биопленок создает большие трудности для медицинской практики, так как при этом значительно повышается устойчивость бактерий к действию антимикробных препаратов и факторов иммунной защиты организма-хозяина. Образование бактериальных биопленок часто является причиной тяжелых, трудно излечиваемых хронических заболеваний. В пищевой промышленности образование биопленок на продуктах увеличивает риск заражения пищи патогенными микроорганизмами; биообрастание трубопроводов, коммуникаций, оборудования, нефтяных платформ и, как следствие, биокоррозия этих поверхностей вызывают серьезные трудности в микробиологической и нефтеперерабатывающей промышленности.

С другой стороны, образование биопленок может быть полезным, например, при биологической очистке воды. Кроме того, биопленки могут обеспечивать повышенную устойчивость бактерий-продуцентов к действию токсичных веществ, присутствующих в среде. Образование биопленок бактериями-антагонистами фитопатогенов способствует конкурентной борьбе этих бактерий с микроорганизмами – возбудителями заболеваний растений; этот фактор важен для развития эффективных методов биоконтроля.

Сказанное выше свидетельствует о важности изучения закономерностей образования биопленок и действия различных соединений на биопленки и их формирование. Исследования этой проблемы актуальны в фундаментальном отношении и важны для медицины, биотехнологии и сельского хозяйства.

В настоящей работе изучено действие нескольких групп веществ различной химической природы, которые, по нашему мнению, могут оказывать влияние на образование бактериальных биопленок, но не исследовались ранее в этом отношении. Среди них вещества растительного происхождения – соединения фенольной природы с антимикробной активностью и фитогормоны. Исследовано также действие на образование биопленок и зрелые биопленки летучих органических соединений, синтезируемых бактериями, подавляющих рост микроорганизмов и модулирующих рост растений. Кроме того, изучено влияние окислителей – пероксида водорода и параквата.

Quorum Sensing (QS) системы регуляции экспрессии генов, играющие ключевую роль в большом количестве процессов бактериальной клетки, являются важным фактором контроля формирования биопленок у ряда бактерий. Этот тип регуляции включает низкомолекулярные сигнальные молекулы и регуляторные рецепторные белки, с которыми они связываются. В

качестве сигнальных молекул QS системы используют большое число химических соединений, наиболее изученными из них являются N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность скоординированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе, что способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям среды и их выживанию в природных условиях.

Таким образом, изучение QS систем регуляции, взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок при действии различных соединений относится к числу актуальных направлений современной микробиологии, генетики микроорганизмов и молекулярной биологии, чрезвычайно важным в фундаментальном и прикладном отношении.

Работа выполнялась в рамках гранта РФФИ № 12-04-00636 и Госконтракта Министерства образования и науки Российской Федерации № 8307 от 10 августа 2012 г.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение закономерностей действия на образование бактериальных биопленок веществ растительного происхождения, окислителей и летучих органических соединений (ЛОС), синтезируемых бактериями, а также исследование взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок при действии этих веществ.

Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выяснение закономерностей влияния веществ растительного происхождения (соединений фенольной природы и фитогормонов) на образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58.
2. Изучение действия растительных фенолов на синтез сигнальных молекул QS систем и на способность клеток *P. aeruginosa* PAO1 к миграции.
3. Исследование влияния окислителей (пероксида водорода и параквата) на формирование биопленок *A. tumefaciens* C58, *P. aeruginosa* PAO1, *Burkholderia cepanocercacia* 370.
4. Определение влияния введения гетерологичного гена *aiiA* (кодирует N-ацил-гомосеринлактоназу) в клетки *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cepanocercacia* 370 на формирование биопленок при действии H_2O_2 .
5. Выяснение закономерностей действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых ризосферными и почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58.
6. Изучение действия ЛОС (кетонов) на функционирование Quorum Sensing систем регуляции.

Научная новизна. Впервые показано, что фенольные соединения, образуемые растениями (ванилин; эпикатехин; 4-гидроксибензойная, галловая, феруловая, синаповая, хлорогеновая и коричная кислоты) и фитогормоны (салициловая, индолил-3-уксусная, гиббереллиновая и абсцизовая кислоты) в концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.

С помощью биосенсоров на основе *lux*-репортерных плазмид показано, что присутствие в жидкой питательной среде ванилина, 4-гидроксibenзойной или галловой кислоты в концентрациях 40-400 мкг/мл приводит к увеличению синтеза клетками *P. aeruginosa* PAO1 N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактона (3-охо-C12-HSL) – сигнальной молекулы LasR-LasI QS системы *P. aeruginosa* PAO1, что может указывать на возможную связь между стимуляцией образования биопленки и LasR-LasI QS системой этой бактерии.

Установлено, что стимуляция образования биопленки в присутствии низких концентраций растительных фенолов (ванилин, 4-гидроксibenзойная и галловая кислоты) и салициловой кислоты не связана с увеличением способности клеток *P. aeruginosa* к миграции по поверхности агаризованных сред (сворминг, свимминг и твитчинг миграция).

Показано, что пероксид водорода (H_2O_2) в субингибиторных и / или слабо подавляющих рост бактерий концентрациях оказывает стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370, но не стимулирует образование биопленок *A. tumefaciens* C58. Другой окислитель, паракват, не оказывал стимулирующего действия на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При введении в клетки *P. aeruginosa* PAO1 гетерологичного гена *aiiA* (кодирует N-ацил-гомосеринлактоназу AiiA, деградирующую АГЛ) стимуляции образования биопленок при действии H_2O_2 не происходило. Эти данные свидетельствуют о том, что стимуляция формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 в присутствии H_2O_2 зависит от функционирования QS систем бактерии.

Приоритетные данные были получены при исследовании действия газовых смесей летучих веществ, продуцируемых бактериальными штаммами *S. proteamaculans* 94, *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-4117, *S. plymuthica* IC1270, и индивидуальных ЛОС – диметилдисульфида (ДМДС), 2-нонанона, 2-гептанона, 2-ундеканона на образование и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Было показано, что общий пул летучих веществ, образуемых *P. fluorescens* B-4117 и *P. chlororaphis* 449, и отдельные ЛОС подавляют образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивают бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в составе биопленок, происходила при более высоких количествах индивидуальных ЛОС, чем их гибель при образовании биопленок.

Используя различные *lux*-репортерные штаммы, применяемые для определения N-ацил-гомосеринлактонов, было показано, что кетоны, синтезируемые бактериями-продуцентами ЛОС, способны подавлять функционирование QS систем бактерий.

Полученные результаты открывают новые аспекты конкурентных отношений между микроорганизмами и взаимоотношений бактерий и растений.

Практическая значимость. Результаты работы могут найти применение в последующих фундаментальных исследованиях молекулярных механизмов образования биопленок и коммуникации бактерий.

Полученные в работе данные в дальнейшем могут быть использованы в прикладных целях, в частности, для разработки новых подходов для борьбы с биообрастанием, с бактериальными инфекциями в медицине и сельском хозяйстве (при разработке и введении в медицинскую практику новых лекарственных препаратов растительного происхождения, развитии эффективных методов биоконтроля заболеваний растений), в биотехнологии для получения важных для человека штаммов бактерий на основе конструкций, использующих новые принципы регуляции, а также в тех случаях, когда необходимо использовать полезные свойства биопленок (интенсификация процессов биодеградации различных субстратов, защита штаммов-продуцентов от токсичных веществ).

Личный вклад соискателя. Автором были созданы и исследованы штаммы *B. ceposepacia* 370 и *P. aeruginosa* PAO1, несущие плазмиду pME6863, содержащую клонированный ген *aiiA*, а также штамм *P. aeruginosa* PAO1, содержащий векторную плазмиду pME6000, и изучено действие плазмид на формирование биопленок.

Автором были исследовано действие широкого диапазона концентраций различных фенольных соединений (совместно с к.б.н. Зайцевой Ю. В.), фитогормонов и окислителей на образование биоплёнок *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58 и *B. ceposepacia* 370; выяснены закономерности действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых ризосферными и почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на биопленки *A. tumefaciens* C58 (совместно с м.н.с. Липасовой В.А.); изучено действие растительных фенолов и ЛОС (кетонов) на функционирование QS систем регуляции. Автором были проведены анализ, обработка и интерпретация полученных результатов исследований; проанализированы и обобщены литературные данные; написаны научные работы совместно с соавторами публикаций.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту

1. Субингибирующие или слабо подавляющие бактериальный рост концентрации веществ растительного происхождения стимулируют образование биопленок у бактерий и увеличивают синтез сигнальных молекул QS систем.

2. Индукция образования бактериальных биопленок при действии субингибиторных концентраций пероксида водорода зависит от функционирования QS систем регуляции этих бактерий.

3. Летучие органические вещества, образуемые бактериями, подавляют образование биопленок, вызывают гибель клеток в уже сформированных биопленках и могут ингибировать функционирование QS систем регуляции бактерий.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012» и «Ломоносов 2013» (Москва, Россия, 2012 и 2013); The 5th Congress of European Microbiologists – FEMS2013 (Leipzig, Germany, 2013); на XXIII, XXIV, XXV и XXVI Международных зимних молодежных научных школах «Перспективные

направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2011, 2012, 2013 и 2014); на научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, Россия, 2011); на V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, Россия, 2010); на Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, Россия, 2009). Диссертационная работа была апробирована на заседании кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева 07 октября 2014 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в т.ч. 6 статей в научных журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, определенных ВАК РФ для публикации результатов научных исследований (APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica; Applied Biochemistry and Microbiology; Молекулярная генетика, микробиология и вирусология; Биотехнология; Бюллетень Московского общества испытателей природы, Отдел биологический).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков и 6 таблиц. Список литературы содержит 336 источников, в том числе 280 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве основных объектов исследования использовали следующие штаммы: *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58 и *B. cepacia* 370.

Для выращивания и поддержания бактерий использовали жидкие среды: LB и M9; агаризованные среды: LA и M9 (1,5 % агара).

Для приготовления инокулята бактерии выращивали в жидкой среде LB или M9 на качалке при 30 °С в течение 20-24 ч. Эти культуры использовали в опытах с биопленками.

Для измерения образования биопленок культуры выращивали по общепринятой методике в 96-ти луночных полистироловых микротитровальных планшетах с различными концентрациями растворов исследуемых веществ (O'Toole G.A. et al., 2000). О величине образованных биопленок судили по их окрашиванию кристалвиолетом.

Для определения действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на биопленки *A. tumefaciens* C58 в работе был использован метод колони-биопленок (анг. Colony biofilm assay) – образование биопленок на стерильных поликарбонатных мембранных фильтрах, описанный в работе (Merritt J.H. et al., 2005), с небольшими изменениями, принятыми в лаборатории. Данный метод позволял

определять количество клеток в биопленке на фильтре (число колониеобразующих единиц – КОЕ) при действии ЛОС, по которому оценивали эффективность действия этих ЛОС. Опыты проводили на чашках Петри с перегородкой; на одну половину чашки помещали фильтр, на котором выращивали биопленку, на другую половину либо высевали штамм-продуцент ЛОС, либо добавляли конкретное ЛОС, после чего чашки для герметизации заматывали лентой «Parafilm M» и инкубировали 48 часов для определения действия на образование биопленок. Для изучения эффекта ЛОС на зрелые биопленки последние росли на фильтрах 48 часов, после чего на другую половину чашки Петри подсеивали культуры штаммов-продуцентов ЛОС, герметизировали чашки парафильмом и инкубировали еще 24 часа.

Оптическую плотность выросших культур (планктонный рост) и биомассу биопленок, сформированную данными культурами, определяли, используя планшетный фотометр iMark Microplate Reader, при длине волны 595 нм. Количество клеток определяли по высеvu на чашки Петри со средой LA.

Для определения действия тестируемых соединений на QS системы использовали различные биосенсоры на основе *lux*-репортерных плазмид:

1) штаммы *E. coli* DH5 α , содержащие плазмиды pSB401 и pSB536, кодирующие рецепторные белки LuxR и AhyR соответственно, которые взаимодействуют с различными АГЛ;

2) биосенсоры, любезно предоставленные Dr. V. Ahmer (Lindsay A., Ahmer V. M., 2005). Эти биосенсоры представляют набор изогенных штаммов *E. coli* JLD271, которые содержат или не содержат гены, кодирующие рецепторные белки LuxR типа различных QS систем, что позволяет определить зависимость эмиссии света от этих рецепторных белков (сравнивали люминесценцию сенсоров, содержащих плазмиды pAL103 и pAL104; pAL105 и pAL106 и штаммов, содержащих плазмиды pAL101 и pAL102, соответственно).

Интенсивность биолюминесценции биосенсоров определяли, используя методы, описанные в работах (Lindsay A., Ahmer V. M., 2005; Winson M.K., Swift S., et al., 1998). Для измерения биолюминесценции использовали прибор Биолум-1 люминометр («Протего», Москва, Россия) и/или Modulus microplate Multimode Reader (Turner BioSystems inc., USA).

Для проведения экстракции АГЛ из супернатантов культур *P. aeruginosa* PAO1 использовали метод, описанный в работе Shaw P.D. et al. (Shaw P.D., Ping G., et al., 1997).

Для определения АГЛ в этилацетатных экстрактах культур *P. aeruginosa* PAO1 использовали биосенсоры: *Chromobacterium violaceum* CV026, *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4, а также биосенсоры на основе *lux*-репортерных плазмид.

Выделение плазмидной ДНК и агарозный гель-электрофорез проводили согласно общепринятым методикам (Миллер Д., 1976; Маниатис Т., и др., 1984), с небольшими изменениями, принятыми в лаборатории. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas. ПЦР-амплификацию фрагментов ДНК проводили на

четырёхканальном программируемом термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия).

Перенос плазмид pME6000 и pME6863 в клетки *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cepacia* 370 выполняли по методу, описанному в работе Reimann C. et al (Reimann C. et al., 2002), с небольшими модификациями. Плазмиды передавались из штамма донора *E. coli* S17-1, содержащего плазмиды pME6000 и pME6863, конъюгацией в *P. aeruginosa* PAO1 и в *B. cepacia* 370 с селекцией на среде LA с соответствующими антибиотиками. Присутствие гена *aiiA* в штаммах, несущих плазмиду pME6863, было подтверждено с помощью ПЦР, с использованием специфических праймеров для этого гена (подобраны по последовательности гена *aiiA*, AF397400): АПА-F и АПА-R.

Определение способности клеток бактерий к миграции по поверхностям сред (свимминг, сворминг и твитчинг миграция) проводили по методу, описанному в работе Givskov M. et al (Givskov M., et al., 1996).

Достоверность результатов работы основана на воспроизводимости полученных экспериментальных закономерностей; на использовании аттестованного измерительного оборудования, стандартизированных и современных методов исследования (биологических, физико-химических и др.).

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из **n**-числа повторностей (где **n** ≥ 3) для каждого конкретного варианта эксперимента. В большинстве случаев на графиках также отображены стандартные отклонения от величин средних значений. Статистическую обработку результатов для каждого конкретного варианта эксперимента проводили в программе Microsoft Excel.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние фенольных соединений растительного происхождения на образование биопленок и QS системы бактерий

В данной части работы было исследовано влияние фенольных соединений растительного происхождения на процесс формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 и на рост планктонных (т.е., неприкрепленных) клеток этих бактерий. Эта часть работы была выполнена совместно с к.б.н. Ю.В. Зайцевой.

В работе были использованы растительные фенолы различной природы (рис. 1): полифенол – эпикатехин; фенолокислоты (производные бензойной кислоты) – галловая (3,4,5-тригидроксибензойная кислота) и 4-гидроксибензойная кислоты; производные оксикоричной кислоты – феруловая и синаповая кислоты; фенолоальдегид – ванилин. Также использовалась коричная кислота, которая является предшественником ряда фенольных соединений, например, хлорогеновой кислоты.

Показано, что эти соединения могут оказывать двойное действие на формирование биопленок – стимулирующее или подавляющее, в зависимости от концентрации. При концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, все исследованные соединения, независимо от их

структуры, стимулировали формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1. При более высоких концентрациях формирование биопленок было подавлено (например, рис. 2 А, С, D, E, H). Аналогичные закономерности наблюдались и при действии данных веществ на бактерию *A. tumefaciens* C58.

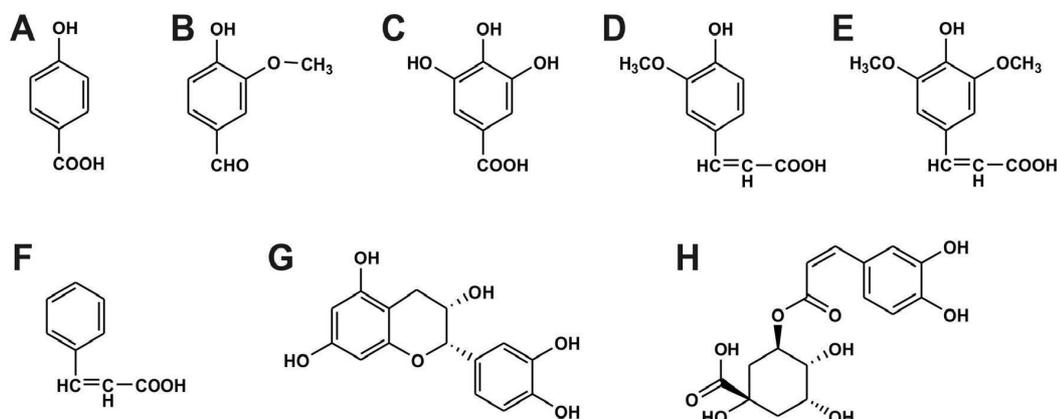


Рис. 1. Фенольные соединения.

А – 4-гидроксibenзойная кислота, В – ванилин, С – галловая кислота, D – феруловая кислота, E – синаповая кислота, F – коричная кислота, G – эпикатехин, H – хлорогеновая кислота.

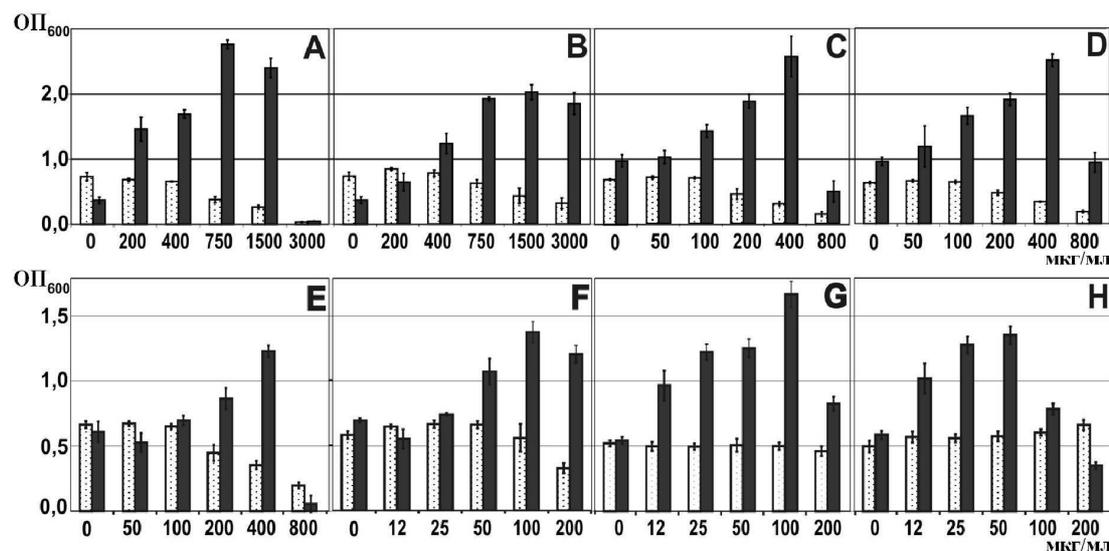


Рис. 2. Влияние ванилина (А), эпикатехина (В), синаповой кислоты (С), хлорогеновой кислоты (D), феруловой кислоты (E), коричной кислоты (F), 4-гидроксibenзойной кислоты (G), и галловой кислоты (H) на формирование биопленок и планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1. Белые столбцы – планктонный рост; черные – биопленки. По оси ординат: оптическая плотность (ОП) при $\lambda=600$ нм. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, мкг/мл.

Стимуляция формирования биопленок при субингибиторных концентрациях фенольных соединений растительной природы была показана нами впервые. Ранее стимуляция образования биопленок при низких концентрациях антибактериальных агентов была отмечена для некоторых антибиотиков, например, аминогликозидов и тетрациклина. В работе нашего

коллектива было обнаружено, что увеличение формирования биопленок *P. aeruginosa* и *B. ceposepacia* происходило в присутствии в среде субингибиторных концентраций препаратов нитрофурановой природы и доноров NO. Но, несмотря на большой интерес к данному вопросу, точные механизмы, ответственные за действие субингибиторных концентраций антибиотиков на формирование биопленок, еще предстоит выяснить.

Определение синтеза АГЛ штаммом *P. aeruginosa* PAO1 при росте культуры на среде с различными концентрациями фенольных соединений

Как отмечалось выше, QS системы ряда бактерий участвуют в регуляции образования биопленок. Поэтому стимулирующее действие исследуемых соединений на образование биопленок могло быть связано с повышенным функционированием в этих условиях QS систем бактерий.

Было исследовано влияние трех фенольных соединений на синтез N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ), которые являются сигнальными молекулами QS систем *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* (включая штамм PAO1) имеет две QS системы, функционирующие с участием АГЛ – LasI-LasR и RhlI-RhlR. LasI- и RhlI-синтазы отвечают за синтез N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактона (3-охо-C12-HSL) и N-бутаноил-гомосеринлактона (C4-HSL) соответственно.

Для определения АГЛ в этилацетатных экстрактах культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии 4-гидроксибензойной, галловой кислоты, ванилина или без них, использовали *lux*-биосенсоры, позволяющие определить 3-охо-C12-HSL (*E. coli* JLD271/pAL105) и C4-HSL (*E. coli* JLD271/pAL101). В качестве контролей использовали штаммы *E. coli* JLD271/pAL106 и JLD271/pAL102, в которых отсутствуют гены, кодирующие LasR и RhlR рецепторные белки LuxR типа, не реагирующие непосредственно на АГЛ. Биосенсоры *E. coli* JLD271/pAL106 и JLD271/pAL102 не были активированы этилацетатными экстрактами АГЛ из культур *P. aeruginosa* PAO1 (данные не приводятся).

На рис. 3 показаны результаты типичного эксперимента по сравнительному определению АГЛ в этилацетатных экстрактах культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии растительных фенольных соединений и без них (с помощью биосенсора *E. coli* JLD271/pAL105, который синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного 3-охо-C12-HSL).

Люминесценция в культуре этого штамма биосенсора возрастала с увеличением концентрации 4-гидроксибензойной, галловой кислоты и ванилина в пределах от 40 до 200-400 мкг/мл и снижалась при более высоких концентрациях. Этот эффект, по-видимому, является результатом увеличения синтеза 3-охо-C12-HSL штаммом *P. aeruginosa* PAO1 при действии субингибиторных концентраций фенольных соединений и снижения его при более высоких концентрациях. При использовании биосенсора *E. coli* JLD271/pAL101, который синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного C4-HSL, не наблюдалось никакого увеличения люминесценции при добавлении этилацетатных экстрактов АГЛ.

Полученные данные позволяют предположить, что увеличение функционирования LasR-LasI QS системы *P. aeruginosa* за счет повышения

синтеза АГЛ и стимуляция образования биопленок при действии низких концентраций фенольных соединений взаимосвязаны. Для проверки этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

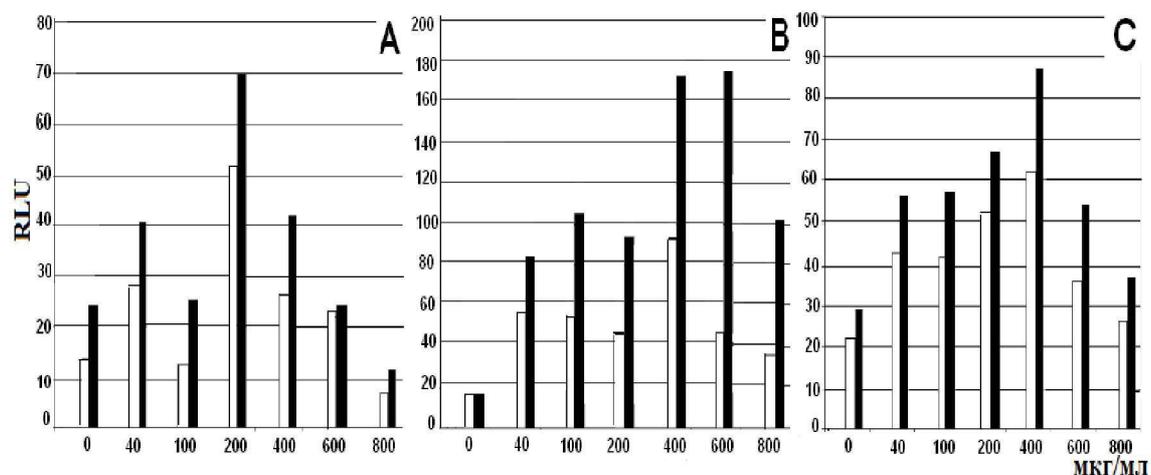


Рис. 3. Биолуминесценция биосенсорного штамма *E. coli* JLD271/pAL105 через 4 и 6 часов роста (белые и черные столбцы, соответственно) при добавлении этилацетатных экстрактов АГЛ, полученных из супернатантов культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии 4-гидроксибензойной кислоты (А), галловой кислоты (В) и ванилина (С). По оси ординат: RLU – относительные световые единицы. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, при которой росла культура *P. aeruginosa* PAO1, мкг/мл.

Действие фенольных соединений на биосенсоры на основе штаммов *E. coli*, используемых для определения АГЛ

Увеличение люминесценции биосенсора *E. coli* JLD271/pAL105 при низких концентрациях 4-гидроксибензойной, галловой кислоты или ванилина могло быть обусловлено способностью этих соединений имитировать АГЛ при взаимодействии с рецептором белком LasR. Это, в свою очередь, могло привести к увеличению транскрипции *lux* гена и, как следствие, к повышению люминесценции. Чтобы проверить эту возможность, было изучено непосредственное действие фенольных соединений на экспрессию *lux* генов АГЛ-биосенсоров (*E. coli* DH5 α , содержащие *lux*-репортерные плазмиды pSB401 или pSB536, и *E. coli* JLD271, содержащие плазмиды pAL101, pAL102, pAL103, pAL104, pAL105 или pAL106 соответственно).

При изучении действия растительных фенольных соединений (4-гидроксибензойной, галловой кислоты или ванилина) на биосенсоры не было выявлено их специфического эффекта на экспрессию репортерного *lux*-оперона с промотора генов синтаз соответствующих АГЛ – люминесценция указанных выше биосенсоров в присутствии различных концентраций данных веществ не изменялась. Эти соединения не вызывали синтеза пурпурно-фиолетового пигмента виолацеина в АГЛ-биосенсоре *C. violaceum* CV026. Т. е., данные соединения не активировали QS системы различных биосенсоров. Исследованные вещества в присутствии АГЛ не ингибировали

функционирование QS систем регуляции биосенсоров на основе *lux*-репортерных плазмид и биосенсора *S. violaceum* CV026. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные соединения не могут замещать АГЛ и взаимодействовать с рецепторными белками LuxR типа.

Определение способности клеток *P. aeruginosa* PAO1 к миграции в присутствии различных концентраций фенольных соединений

Одним из свойств бактерий, важных для формирования биопленок, является их способность мигрировать по поверхностям сред.

Стимулирующий эффект растительных фенолов на образование биопленки *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens* может быть связан с их влиянием на способность клеток *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens* к миграции. Однако в наших экспериментах мы не наблюдали увеличения диаметра зон сворминг (рис. 4), свимминг и твитчинг миграции клеток *P. aeruginosa* PAO1 при концентрациях фенольных соединений (4-гидроксibenзойной кислоты, галловой кислоты, ванилина) в пределах от 40 до 800 мкг/мл. У *A. tumefaciens* C58 не наблюдалось четких зон сворминг и свимминг миграции (данные не приводятся).

Таким образом, стимуляция образования биопленок при концентрациях тестируемых веществ, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, не была связана с увеличением способности клеток *P. aeruginosa* к сворминг, свимминг или твитчинг миграции.

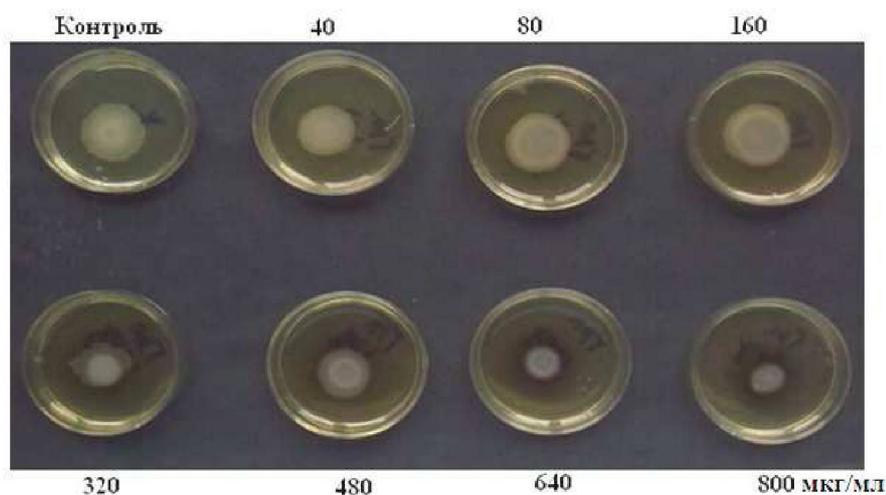


Рис. 4. Сворминг миграция клеток *P. aeruginosa* PAO1 по поверхности среды LA (0,5 % агара), содержащей различные концентрации галловой кислоты (мкг/мл); через 24 часа роста.

Диаметры зон миграции *P. aeruginosa* PAO1 становились меньше при высоких концентрациях фенольных соединений – в случае сворминг миграции на 12-30 % в присутствии в питательной среде 400-800 мкг/мл 4-гидроксibenзойной кислоты, на 50-60 % при наличии таких же концентраций ванилина и на 20-60 % на среде, содержащей 400-800 мкг/мл галловой кислоты (рис. 4). Зоны твитчинг и свимминг миграции становились меньше не более чем на 10-15 % при тех же концентрациях 4-гидроксibenзойной кислоты, ванилина и галловой кислоты.

Таким образом, можно предположить, что снижение сворминг, твитчинг и свимминг миграции при высоких концентрациях тестируемых веществ могло играть определенную роль в снижении образования биопленок при этих

условиях, в качестве дополнения к действию данных веществ на бактериальный рост.

Действие фитогормонов на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58

В данной части работы было исследовано влияние фитогормонов на процесс формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 и на рост планктонных (неприкрепленных) клеток этих бактерий.

В работе были использованы фитогормоны различной природы (рис. 5): салициловая кислота – активирует защитные силы растения в ответ на атаку различных патогенных микроорганизмов, оказывает антимикробное действие и ряд других эффектов; индолил-3-уксусная кислота (гетероауксин, широко применяющийся в растениеводстве) – является важнейшим природным стимулятором роста растений; гиббереллиновая кислота – гормон роста растений, стимулирующий деление клеток; абсцизовая кислота – также является регулятором роста растений, тормозит их рост и развитие, играет важную роль в ответе растений на внешние воздействия.



Рис. 5. Химические формулы тестируемых фитогормонов.

На рис. 6–9 приведены данные опытов по влиянию указанных растительных гормонов на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.

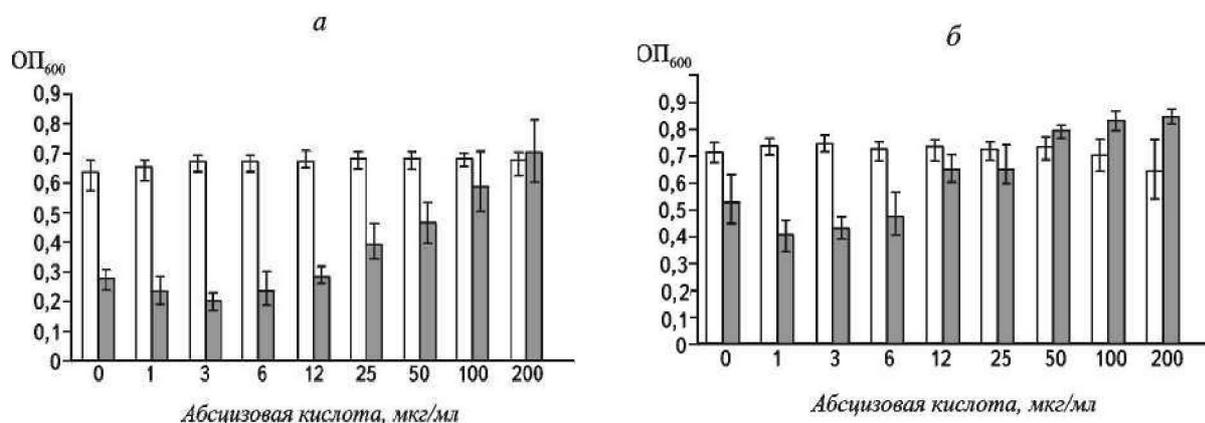


Рис. 6. Действие абсцизовой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 2.

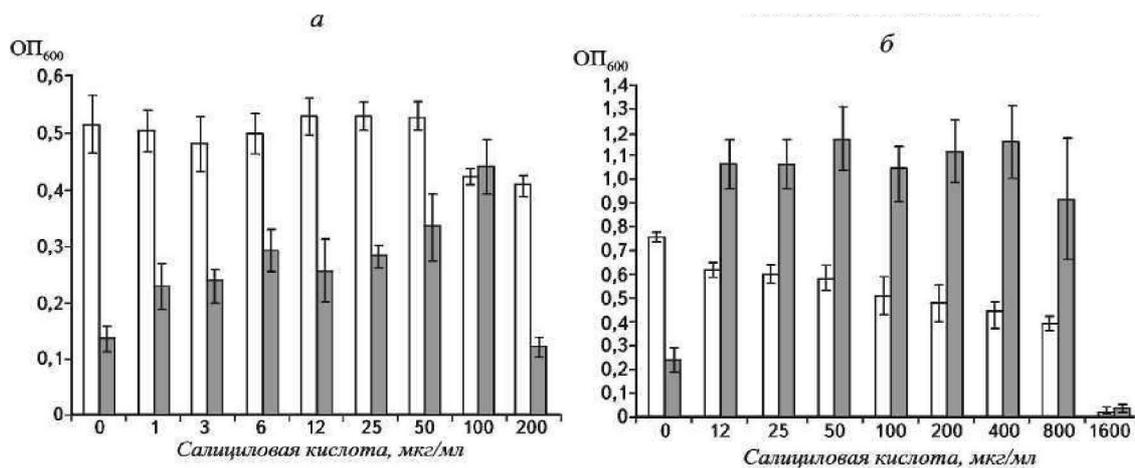


Рис. 7. Действие салициловой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 2.

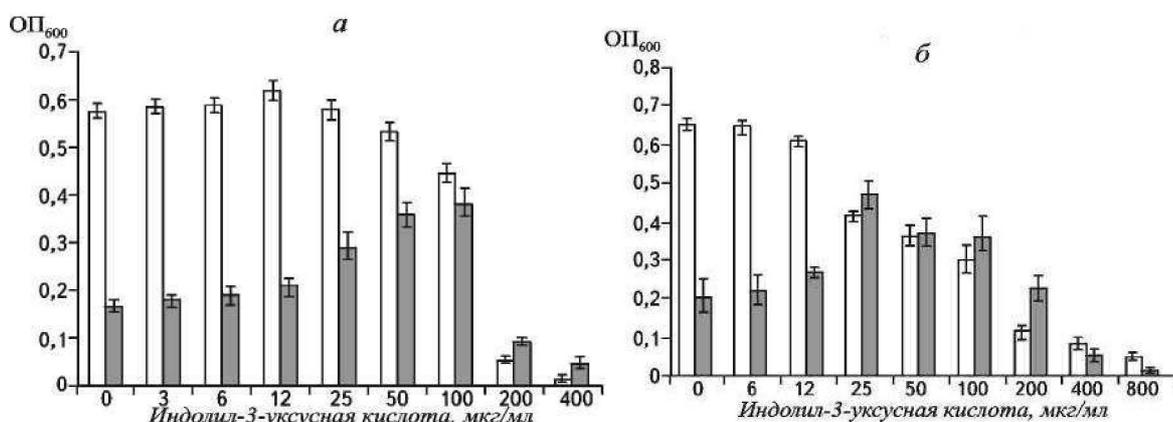


Рис. 8. Действие индолил-3-уксусной кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 2.

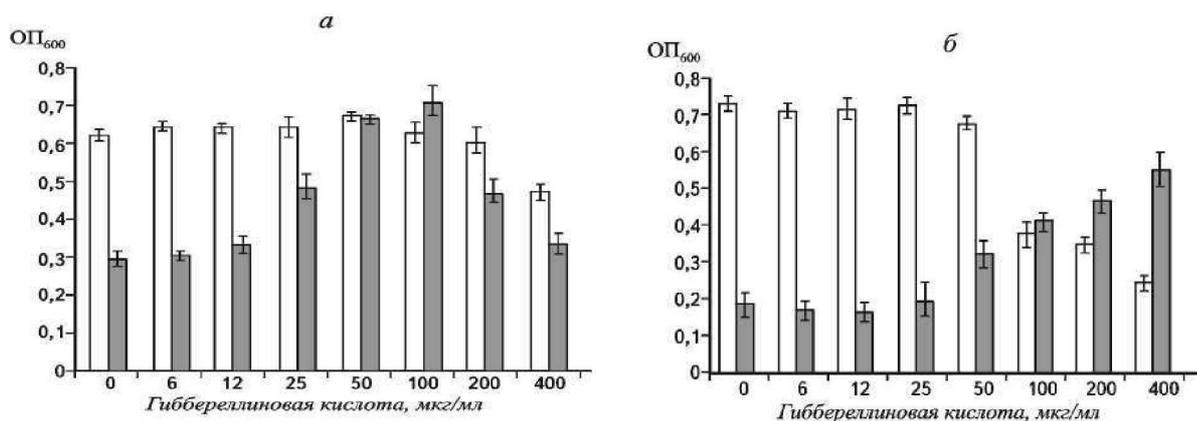


Рис. 9. Действие гиббереллиновой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 2.

Наблюдался двойной эффект действия на бактерии исследованных соединений: при субингибиторных или слабо подавляющих рост планктонных клеток концентрациях эти вещества стимулировали формирование биопленок, а

при более высоких концентрациях ингибировали его.

Полученные нами данные о том, что растительные фенолы и фитогормоны в субингибиторных концентрациях повышают образование биопленок у *A. tumefaciens* и *P. aeruginosa* и ингибируют его при более высоких концентрациях, демонстрируют еще одну особенность взаимоотношений растений и бактерий.

Данные о стимуляции образования биопленок при действии антибактериальных агентов важны для медицины: стимуляция формирования биопленок патогенными бактериями может способствовать их выживанию после лечения с применением антибактериальных средств, когда низкие концентрации этих препаратов остаются в организме человека; в результате возможен рецидив заболевания; необходимо полное уничтожение патогенной микрофлоры при лечении.

Этот вывод относится и к нашим результатам, полученным с растительными фенолами и фитогормонами. Фенольные соединения, включая те, действие которых было исследовано в настоящей работе, являются компонентами многих медицинских растений, используемых в фитотерапии. Интерес к комплексным фитопрепаратам увеличивается, исследуется состав фенольных компонентов в них и действие индивидуальных соединений (антиоксидантное, антимикробное и др.). Поэтому особенности действия различных фенольных соединений на образование биопленок, которые мы показали, должны учитываться при разработке и введении в медицинскую практику новых препаратов растительного происхождения.

Действие пероксида водорода и параквата на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58

На данный момент механизм стимуляции (индукции) образования биопленок при действии фенольных соединений не ясен. Можно было предположить, что он обусловлен общим свойством исследуемых фенольных соединений – их антиоксидантной активностью.

Чтобы проверить это предположение в данной части работе было исследовано влияние окислителей – пероксида водорода (H_2O_2) и параквата на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.

Результаты экспериментов показали, что при субингибиторных и слабо подавляющих рост концентрациях пероксида водорода наблюдалась стимуляция образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 10-А). Таким образом, и при действии окислителя также возможна эта закономерность. Однако, пероксид водорода не действовал подобным образом на образование биопленок *A. tumefaciens* C58 (рис. 10-В). Паракват не вызывал стимуляции образования биопленок у обеих бактерий. Какие механизмы ответственны за эти различия, в настоящее время неясно, необходимы дальнейшие исследования.

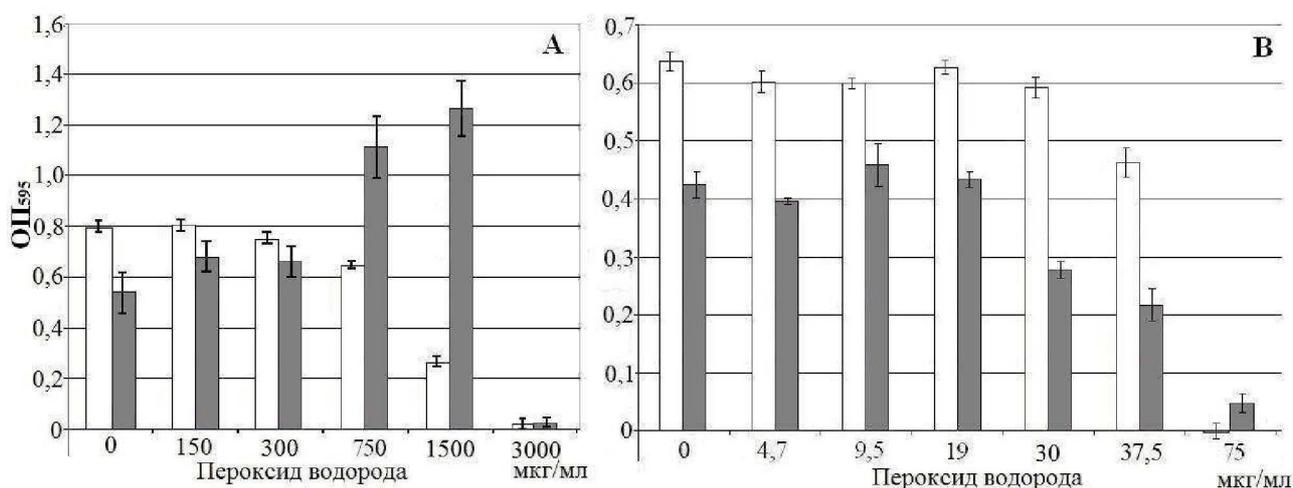


Рис. 10. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост: А – *P. aeruginosa* PAO1; В – *A. tumefaciens* C58. Биопленки – темные столбцы, планктонный рост – светлые столбцы. По оси ординат: оптическая плотность при $\lambda=595$ нм (ОП₅₉₅). По оси абсцисс – концентрация пероксида водорода, мкг/мл.

Влияние гена *aiiA*, кодирующего гомосеринлактоназу, на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *Burkholderia cenocepacia* 370

Как уже отмечалось, в регуляции формирования биопленок *P. aeruginosa* участвуют QS системы. Перспективным подходом для изучения роли QS систем в регуляции клеточных процессов является использование ферментов, разрушающих АГЛ – N-ацил-гомосеринлактоназ (АГЛ-лактоназы). Многие вопросы, связанные с действием АГЛ-лактоназ в клетках, остаются недостаточно изученными, в частности, действие на образование биопленок.

Представляло интерес проверить, зависит ли эффект стимуляции образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 при действии H_2O_2 от QS систем, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул. С этой целью было исследовано влияние введения гетерологичного гена АГЛ-лактоназы *aiiA* (клонирован из *Bacillus sp.* A24) в клетки *P. aeruginosa* PAO1 на образование биопленок при действии H_2O_2 .

Полученные штаммы с соответствующими плазмидами были проверены на синтез АГЛ. При анализе на чашках с биосенсором *S. violaceum* CV026 клетки, несущие плазмиду pME6863, не обнаруживали синтеза АГЛ, в то время как клетки с векторной плазмидой pME6000 его активно синтезировали. Эти данные показывают, что экспрессия гена АГЛ-лактоназы приводила к деградации синтезируемого клетками С4-HSL. При использовании сенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 в случае клеток с плазмидой pME6863 мы наблюдали небольшую продукцию АГЛ, т.е. некоторое количество основной сигнальной молекулы QS системы *P. aeruginosa* PAO1 3-охо-С12-HSL в культуре присутствовало.

При действии H_2O_2 на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000 наблюдалась та же закономерность, что и в случае исходного штамма *P. aeruginosa* PAO1, т.е. формирование биопленок стимулировалось (до 2,3 раза)

в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (рис. 10-А и 11-А).

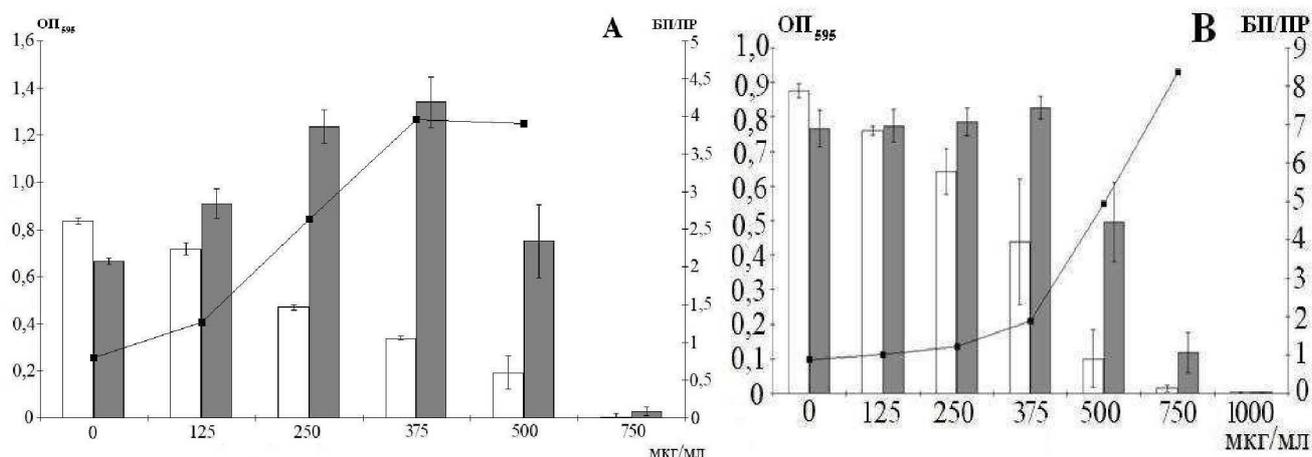


Рис. 11. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост: А – *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000; В - *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863. Биопленки – темные столбцы, планктонный рост – светлые столбцы. Кривая показывает отношение биомассы биопленок к планктонному росту (БИ/ПР). По осям ординат: слева – оптическая плотность при $\lambda=595$ нм (ОП₅₉₅), справа – отношение биомасс, биопленочных и планктонных бактерий (БИ/ПР). По оси абсцисс – концентрация пероксида водорода, мкг/мл.

Однако когда было исследовано действие H₂O₂ на образование биопленок штаммом PAO1, содержащим плазмиду pME6863, этого эффекта не наблюдалось (рис. 11-В). Эти данные показывают, что эффект стимуляции формирования биопленок при действии концентраций H₂O₂, слабо влияющих на планктонный рост, зависел от функционирования QS систем PAO1, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул. Таким образом, согласно нашим данным, стимуляция образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 при действии H₂O₂ наблюдалась при функционировании QS систем, но не в условиях подавления QS систем регуляции.

Еще одним модельным объектом для изучения влияния пероксида водорода на образование биопленок была бактерия *B. cepacia* 370 (штамм получен из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи). Бактерии *B. cepacia* содержат две QS системы регуляции, которые используют N-октаноил-гомосеринлактон (C8-HSL) и N-гексаноил-гомосеринлактон (C6-HSL) в качестве сигнальных молекул и участвуют в контроле вирулентности.

После введения гена АГЛ-лактоназы *aiiA* в клетки *B. cepacia* 370 штамм с плазмидой pME6863 был проверен на синтез АГЛ. При анализе на чашках с биосенсором *C. violaceum* CV026 штамм *B. cepacia* 370, несущий плазмиду pME6863, не обнаруживал синтеза АГЛ, в то время как клетки исходного штамма его синтезировали. Продукция АГЛ штаммом *B. cepacia* 370 была очень невелика, что соответствует литературным данным о синтезе АГЛ клетками бактерий комплекса *B. cepacia*. При использовании сенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 в случае клеток *B. cepacia* 370 с плазмидой

pME6863 наблюдалось уменьшение продукции АГЛ по сравнению с исходным штаммом, т.е. основная сигнальная молекула QS системы *B. ceposerasia* 370 C8-HSL в культуре присутствовала, хотя количество её было снижено.

При действии H_2O_2 на образование биопленок *B. ceposerasia* 370 наблюдалась та же закономерность, что и в случае штамма *P. aeruginosa* PAO1, т.е. формирование биопленок стимулировалось в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (рис. 12).

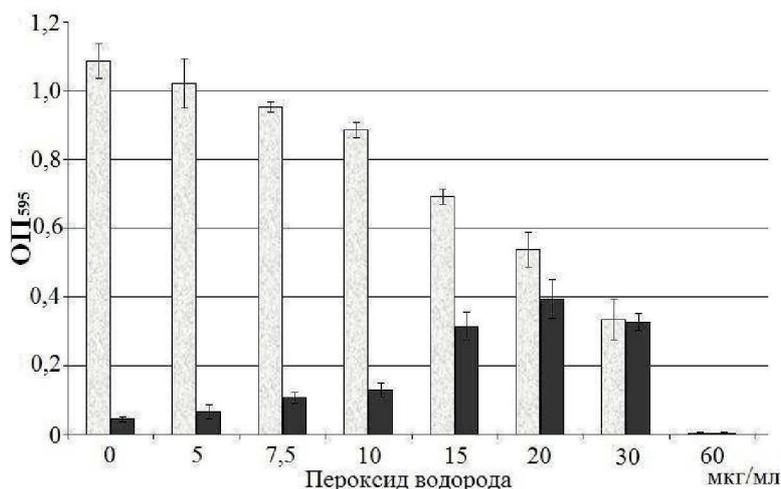


Рис. 12. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *B. ceposerasia* 370. Обозначения те же, что на рис. 10.

При действии H_2O_2 на образование биопленок штаммом *B. ceposerasia* 370, содержащим плазмиду pME6863, также наблюдалось стимулирование формирования биопленок в условиях субингибиторных концентраций пероксида водорода, но величина эффекта была снижена.

Таким образом, в отличие от данных, полученных с *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863, присутствие в клетках *B. ceposerasia* 370 гена *aiiA* не снимало полностью эффекта стимуляции образования биопленок при действии низких концентраций H_2O_2 , хотя и уменьшало эффект стимуляции.

При этом по данным, полученным сотрудниками Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН, присутствие плазмиды pME6863 в клетках *B. ceposerasia* 370 приводило к отсутствию гемолитической, снижению внеклеточной протеазной активностей и сворнинг миграции клеток *B. ceposerasia* 370, что свидетельствовало о связи регуляции этих клеточных процессов с QS системами *B. ceposerasia* 370, функционирующими с участием АГЛ сигнальных молекул.

Действие летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58

В последние годы внимание исследователей привлекли данные о том, что бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС), подавляющие рост бактерий и грибов и оказывающие модулирующее действие на рост растений.

Продукция ЛОС является новым, слабо изученным аспектом конкурентных отношений микроорганизмов и может быть важным фактором

биологического контроля защиты растений. В связи с этим представляло интерес исследовать, как действуют газовые смеси летучих веществ (общий пул), синтезируемых бактериями, и индивидуальные ЛОС на формирование биопленок и уже образованные биопленки фитопатогенных бактерий.

В данной части работы было исследовано действие газовых смесей летучих веществ (ЛВ) ризосферных и почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* и индивидуальных ЛОС (ДМДС, 2-нонанон, 2-ундеканон, 2-гептанон и 1-ундецен) (рис. 13), которые синтезируются этими штаммами в бóльшем количестве, по сравнению с другими ЛОС, на образование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Хотя исследуемые бактерии не синтезируют 2-гептанон в больших количествах, было интересно сравнить его действие с действием двух других кетонов, 2-нонанон и 2-ундеканон. Состав ЛОС, выделяемых исследованными бактериями, был определен в совместной работе с сотрудниками Иерусалимского Университета (Израиль) (Porova et al., 2014).

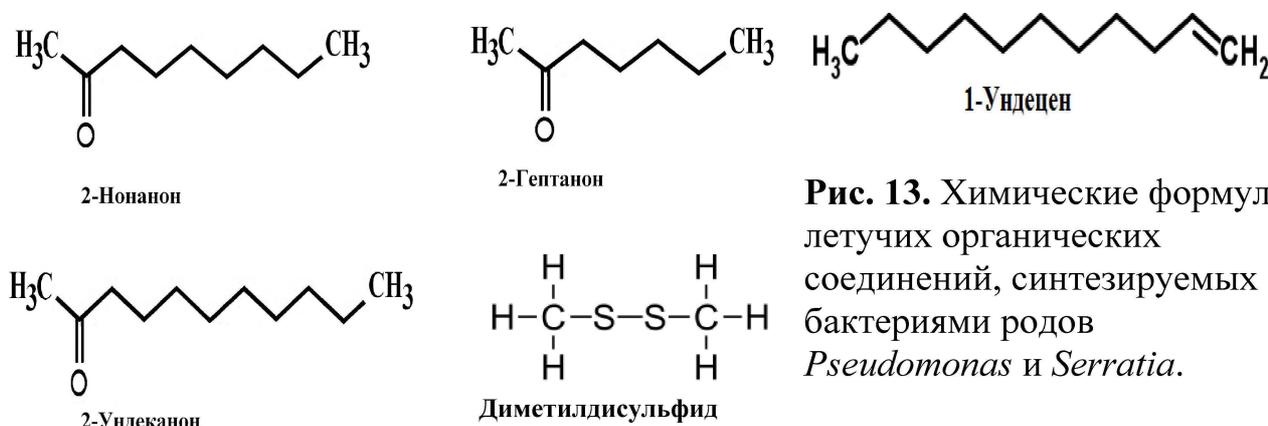


Рис. 13. Химические формулы летучих органических соединений, синтезируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*.

На рис. 14-А приведены данные опытов по влиянию общего пула ЛВ бактериальных штаммов *S. proteamaculans* 94, *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* В-4117, *S. plymuthica* IC1270 на образование биопленок *A. tumefaciens* C58. Штаммы *P. chlororaphis* 449 и *S. plymuthica* IC1270 были выделены из ризосферы растений, штамм *P. fluorescens* В-4117 – из почвы, штамм *S. proteamaculans* 94 – из испорченного мяса в холодильной установке. Штамм *S. proteamaculans* 94 использовали в связи с тем, что штаммы этого вида обитают также в почве и ризосфере растений.

Можно видеть, что лучше всего подавляют образование биопленок *A. tumefaciens* C58 смеси ЛВ, синтезируемые штаммами *P. fluorescens* В-4117 и *P. chlororaphis* 449, ~ в 1700 и 3,2 раза соответственно, по сравнению с контролем (без штаммов, продуцирующих ЛВ). Газовые смеси ЛВ, выделяемые штаммом *S. proteamaculans* 94, действуют слабо, уменьшая образование биопленок только ~ в 1,3 раза, а штамм *S. plymuthica* IC1270 не оказывал влияния на формирование биопленки *A. tumefaciens* C58.

На рис. 14-В приведены данные по действию общего пула ЛВ, синтезируемых изучаемыми штаммами, на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Только в случае газовой смеси ЛВ *P. fluorescens* В-4117 наблюдается существенный эффект – гибель бактерий в уже образованных биопленках ~ в

3,2 раза по сравнению с контролем. Газовые смеси ЛВ, выделяемые *P. chlororaphis* 449 и *S. plymuthica* IC1270, препятствуют дальнейшему увеличению числа бактерий в биопленке *A. tumefaciens* C58, поддерживая его на уровне контроля; ЛВ, синтезируемые штаммом *S. proteamaculans* 94, не оказывают эффекта на бактерии в биопленке *A. tumefaciens* C58.

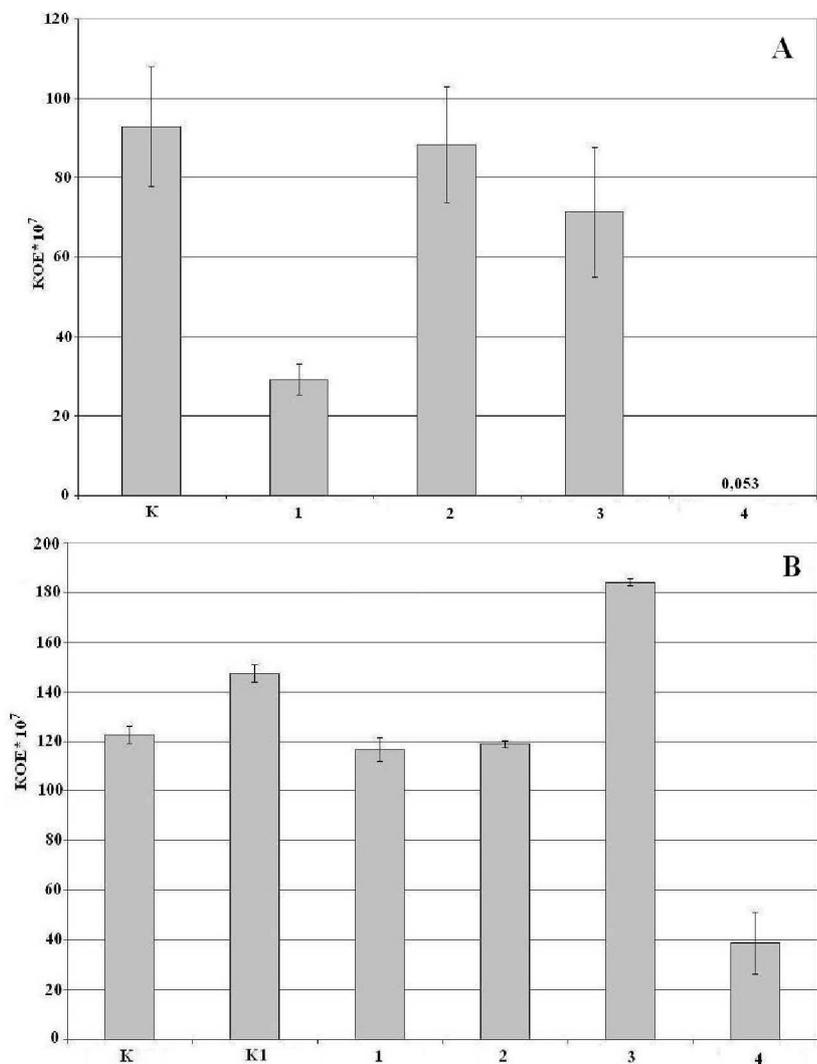


Рис. 14. Влияние общего пула летучих веществ, синтезируемых бактериальными штаммами:

А – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58;

В – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58.

По оси ординат - число колониеобразующих единиц (КОЕ*10⁷).

По оси абсцисс - газовые смеси ЛВ синтезируемые:

1 - *P. chlororaphis* 449;

2 - *S. plymuthica* IC1270;

3 - *S. proteamaculans* 94;

4 - *P. fluorescens* B-4117;

К – контроль без бактерий-продуцентов ЛОС, 48 часов роста;

К1 – контроль без бактерий-продуцентов ЛОС, 72 часа роста.

Следующим этапом работы было исследование действия индивидуальных ЛОС, синтезируемых данными бактериями, а именно: ДМДС, 2-нонанона, 2-гептанона, 2-ундеканона и 1-ундецена.

Можно видеть, что 2-нонанон способен подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивать бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в уже образованных биопленках, происходила при более высоких количествах 2-нонанона, чем ингибирование образования биопленок (рис. 15). Аналогично действуют 2-гептанон и ДМДС.

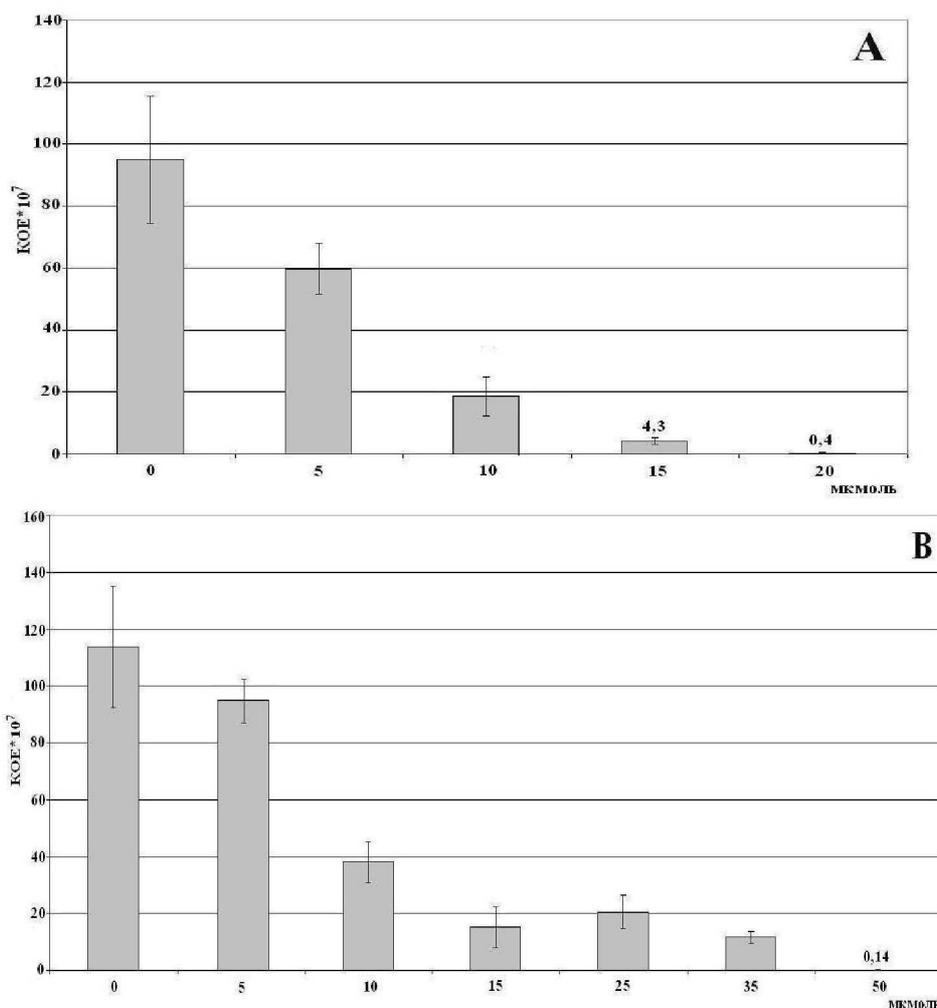


Рис. 15. Влияние 2-нонанона: **А** - на образование биопленок *A. tumefaciens* C58; **В** - на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. По оси ординат - число колониеобразующих единиц (КОЕ*10⁷), по оси абсцисс – количество вносимого вещества, МКМОЛЬ.

При действии 2-ундеканона (25 мкмоль) образование биопленок *A. tumefaciens* C58 уменьшалось в 2,5 раза. Увеличение его количества приводило к дальнейшему снижению уровня образованных биопленок, однако, в диапазоне количеств 2-ундеканона от 50 до 400 мкмоль количество клеток в биопленках не изменялось (рис. 16-А). Такую же закономерность мы наблюдали в случае действия 2-ундеканона на уже образованные биопленки *A. tumefaciens* C58 (рис. 16-В). Механизм подобного типа действия 2-ундеканона остается неясным. Возможно, большие концентрации 2-ундеканона изменяют матрикс биопленок и каналы в нем таким образом, что это соединение больше не может проникнуть внутрь биопленок и клетки в ней остаются живыми. Для объяснения этого эффекта необходимы дальнейшие исследования.

1-ундецен, синтезируемый штаммами *P. fluorescens* В-4117 и *P. chlororaphis* 449 в большем количестве по сравнению с другими ЛОС этих штаммов, действовал слабо или вовсе не оказывал действия на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58, даже при больших количествах этого вещества (до 800 мкмоль), хотя именно газовые смеси ЛВ этих штаммов лучше всего действовали на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58 (рис. 14).

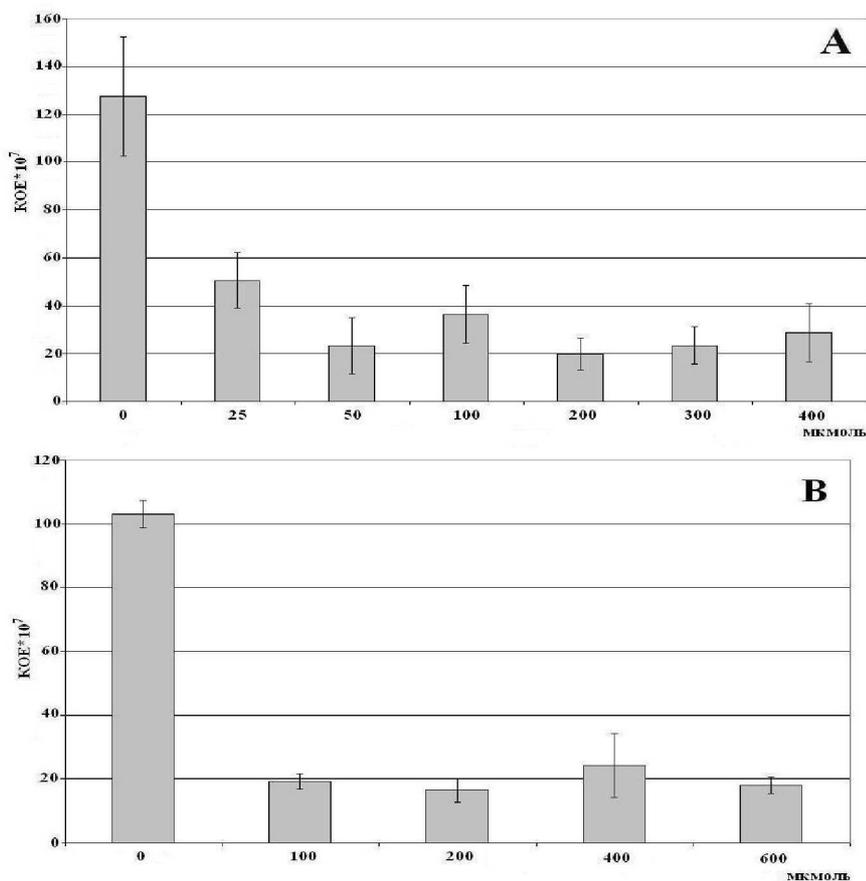


Рис. 16. Влияние 2-ундеканона:
А – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58;
В – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58.
 Обозначения те же, что на рис. 15.

Определение действия ЛОС на функционирование Quorum Sensing систем регуляции

Способность ЛОС подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивать бактерии в зрелых биопленках могла быть связана с их влиянием на функционирование QS систем регуляции. Ранее было показано в совместной работе сотрудников Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН и Иерусалимского Университета, что газовые смеси ЛВ, выделяемые штаммами *P. fluorescens* В-4117, *S. plymuthica* IC1270 и отдельно ДМДС (основным ЛОС, образуемым штаммом *S. plymuthica* IC1270) способны ингибировать функционирование QS систем (Chernin et al., 2011). В настоящей работе было исследовано действие кетонов, выделяемых бактериями (2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона), на QS регуляцию. С этой целью были использованы следующие АГЛ-биосенсоры: *E. coli* DH5α / pSB401, *E. coli* JLD271/pAL105 и *E. coli* JLD271/pAL101. В качестве сигнальных молекул в работе использовали различные экзогенные АГЛ-стандарты. АГЛ и ЛОС добавляли непосредственно в жидкие культуры биосенсоров.

На рис. 17 приведены данные по влиянию указанных соединений на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271/pAL105. Степень подавления биолюминесценции при действии трех указанных кетонов на биосенсор *E. coli* JLD271/pAL105 была существенно бóльшей, чем влияние кетонов на выживаемость клеток. Аналогично действовали 2-нонанон и 2-гептанон на биосенсор *E. coli* DH5α / pSB401. Однако, в случае биосенсора *E. coli*

JLD271/pAL101 существенное влияние на QS-ответ из трех кетонов оказывал только 2-ундеканон.

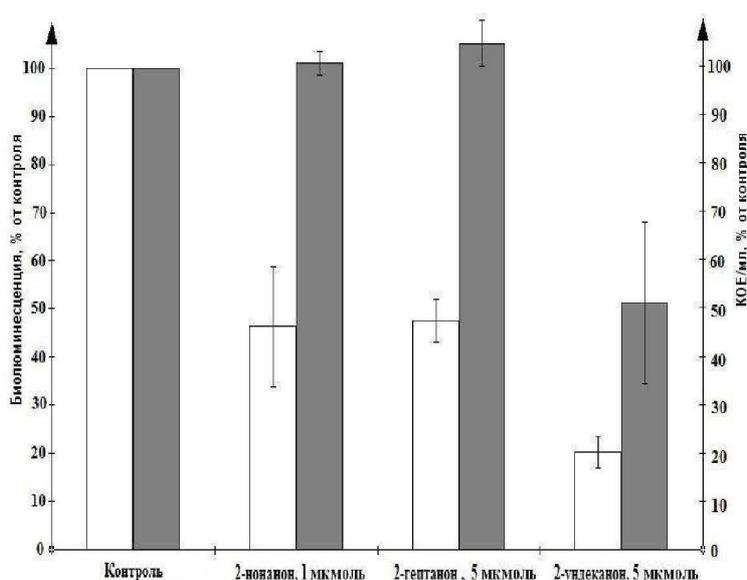


Рис. 17. Действие кетонов на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271 / pAL105. Белые столбцы – уровень биолюминесценции репортерного штамма (относительные единицы) в % от контроля; черные столбцы – КОЕ/мл репортерного штамма, в % от контроля. По оси абсцисс – количество вещества, внесенного в культуру биосенсора, мкмоль. Контроль – рост биосенсора в присутствии 3-охо-C12-HSL, без добавления кетонов.

Обобщая результаты этой части работы, можно отметить, что природные летучие кетоны, синтезируемые бактериями, могут взаимодействовать с QS-системами, включающими АГЛ в качестве сигнальных молекул, и снижать эффективность их функционирования. Показано, что при количествах кетонов, не оказывающих бактерицидного действия или слабо влияющих на выживаемость штаммов-биосенсоров, указанные кетоны могут модулировать QS-ответ, подавляя экспрессию *lux*-репортерного оперона в большей степени, чем жизнеспособность клеток этих штаммов. Подавление экспрессии репортерного *lux*-оперона происходит, по-видимому, в результате ингибирования транскрипции оперона с промотора гена синтазы АГЛ. При этом наблюдались некоторые различия в чувствительности к кетонам биосенсоров, содержащих компоненты разных QS систем. Ни в одном случае не было обнаружено стимуляции кетонами экспрессии репортерного *lux*-оперона. Мы не определяли, влияют ли кетоны непосредственно на АГЛ. Однако, в ранее опубликованной работе было показано, что при «Quorum Quenching» эффекте (подавление QS) общего пула ЛОС, выделяемых штаммом *P. chlororaphis* 449, в котором содержались значительные количества кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона, не происходило прямой инактивации АГЛ (Chernin et al., 2011).

Можно предположить, что подавление QS регуляции продуцируемыми ЛОС является еще одной стороной конкурентной борьбы бактерий вместе с ингибиторным действием ЛОС на их рост и жизнеспособность. Это свойство бактерий может быть важным для взаимодействия бактерий в почве и ризосфере растений, для защиты растений от фитопатогенных бактерий. Вполне возможно, что ЛОС играют существенную роль и во взаимоотношениях микроорганизмов микрофлоры человека.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что растительные фенольные соединения и фитогормоны в субингибиторных или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях стимулируют образование биопленок у бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.
2. Обнаружено, что синтез N-(3-оксо)-додеканоил-гомосеринлактона клетками *P. aeruginosa* PAO1 увеличивается при концентрации в среде фенольных соединений от 40 до 400 мкг/мл. Эти данные свидетельствуют в пользу возможной взаимосвязи между стимуляцией образования биопленок и функционированием QS Las-системы *P. aeruginosa* PAO1. Фенольные соединения не активировали экспрессию генов синтаз АГЛ в биосенсорах, т.е. они не были способны замещать АГЛ при взаимодействии с рецепторными белками LuxR типа.
3. Способность клеток *P. aeruginosa* PAO1 к сворминг, свимминг и твитчинг миграции не изменяется или уменьшается в присутствии растительных фенолов при различных концентрациях данных веществ.
4. Пероксид водорода в субингибиторных или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях стимулирует образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cepacia* 370. Введение в клетки плазмиды pME 6863, содержащей клонированный гетерологичный ген гомосеринлактоназы, деградирующей АГЛ, приводит к отсутствию эффекта стимуляции формирования биопленок у *P. aeruginosa* PAO1 и его уменьшению у *B. cepacia* 370. Эти данные показывают, что стимулирование образования биопленок в присутствии пероксида водорода зависит от функционирования QS систем регуляции этих бактерий.
5. Впервые показано на модели *A. tumefaciens* C58, что летучие органические вещества, образуемые бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, подавляют образование биопленок и вызывают гибель клеток в уже сформированных биопленках. Кроме того, ЛОС могут подавлять функционирование QS систем регуляции бактерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ

1. **Плюта В.А.**, Попова А.А., Кокшарова О.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Способность природных кетонов взаимодействовать с бактериальными Quorum Sensing системами // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 4: С. 10-13.
2. **Plyuta V.**, Zaitseva J., Lobakova E., Zagoskina N., Kuznetsov A., Khmel I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // APMIS. 2013. V. 121. P.1073-1081.
3. **Plyuta V. A.**, Lipasova V. A., Kuznetsov, A. E., Khmel I. A. Effect of salicylic, indole-3-acetic, gibberellic, and abscisic acids on biofilm formation by *Agrobacterium tumefaciens* C58 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Applied Biochemistry and Microbiology. 2013. V. 49. P. 706-710.
4. **Плюта В.А.**, Андреев Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии перекиси водорода; влияние гена *aiiA* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 4: С. 10-14.
5. **Плюта В.А.**, Липасова В.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Действие салициловой, индолил-3-уксусной, гиббереллиновой и абсцизовой кислот на образование биопленок бактериями *Agrobacterium tumefaciens* C58 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Биотехнология. 2012. № 3: С. 53-58.
6. Зайцева Ю.В., Белик А.С., **Плюта В.А.**, Лобакова Е.С., Хмель И.А. Действие растительных веществ фенольной природы на образование биопленок и Quorum Sensing системы регуляции у бактерий. // Бюлл. Моск. Общества испытателей природы, Отдел Биологический. 2009. Т. 114. № 2 приложение 1. С. 47-48.

Материалы конференций

1. **Плюта В.А.**, Андреев Ю.В., Хмель И.А. Особенности образования биопленок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии пероксида водорода; влияние гена *aiiA*. Тезисы стендовых сообщений XXVI Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященной 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН. Москва, 10-14 февраля, 2014 г., с. 58.
2. **Plyuta V.A.**, Zaitseva J., Khmel I.A. Effect of plant phenolic compounds and plant hormones on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* // The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS), Poster Presentation in Bacterial Biofilms section, Leipzig, July 21-25, 2013.
3. **Плюта В.А.** Влияние летучих органических соединений и синтезирующих их бактерий на образование биопленок *Agrobacterium tumefaciens* C58. Тезисы докладов XIX Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2013». Секция «Биология». Москва, 8-13 апреля 2013 г., с. 206.
4. **Плюта В.А.**, Попова А.А., Кокшарова О.А., Хмель И.А. Действие летучих органических соединений на клетки *Agrobacterium tumefaciens* при образовании

био пленок и в зрелых био пленках. Тезисы докладов и стендовых сообщений XXV Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», посвященной 30-летию Научно-образовательного центра ИБХ РАН. Москва, 11-15 февраля, 2013 г., с. 104.

5. **Плюта В.А.** Влияние растительных веществ фенольной природы на образование био пленок, синтез сигнальных молекул Quorum Sensing систем и миграцию *Pseudomonas aeruginosa*. Тезисы докладов XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012». Секция «Биология». Москва, 9-13 апреля 2012 г., с. 161-162.

6. **Плюта В.А.**, Зайцева Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Образование био пленок, синтез сигнальных молекул Quorum Sensing систем и миграция *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии растительных веществ фенольной природы. Тезисы стендовых сообщений XXIV Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля 2012 г., с. 77.

7. **Плюта В.А.**, Зайцева Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Влияние растительных веществ фенольной природы на синтез сигнальных молекул Quorum Sensing систем и формирование био пленок у бактерий. Тезисы научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». Москва-Пушино, 14-17 ноября 2011 г., с. 56.

8. Зайцева Ю.В., **Плюта В.А.**, Хмель И.А. Действие растительных веществ фенольной природы на образование бактериальных био пленок и Quorum Sensing системы регуляции. Тезисы стендовых сообщений XXIII Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля 2011 г., с. 144.

9. Радциг М.А., Зайцева Ю.В., Веселова М.А., **Плюта В. А.**, Попова А.А. Формирование био пленок при действии на бактерии соединений серебра (ионы, наночастицы), растительных фенолов и нитрофуранов. Тезисы докладов V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». Саратов, сентябрь 2010 г., с. 104.

10. Зайцева Ю.В., Белик А.С., **Плюта В.А.**, Лобакова Е.С., Хмель И.А. Действие растительных веществ фенольной природы на образование био пленок и Quorum Sensing системы регуляции у бактерий. Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах». Москва, 26-28 мая 2009 г., с. 47-48.

