

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ И СОЛЕЙ ЦИНКА НА КИНЕТИКУ РОСТА БАКТЕРИЙ РОДА *ESCHERICHIA* И *STAPHYLOCOCCUS*



Татьяна Артюх,
ассистент кафедры
микробиологии,
вирусологии
и иммунологии
им. С.И. Гельберга ГрГМУ,
магистр медицинских
наук;
taniaartsyukh@gmail.com



Елена Сидорович,
старший
преподаватель
кафедры
микробиологии,
вирусологии
и иммунологии
им. С.И. Гельберга
ГрГМУ; elenasidm@rambler.ru



Оксана Островская,
доцент кафедры
микробиологии,
вирусологии
и иммунологии
им. С.И. Гельберга,
старший научный
сотрудник группы
морфологии
с электронной
микроскопией научно-
исследовательской
лаборатории ГрГМУ,
кандидат медицинских
наук; astrowskaja@gmail.com

Аннотация. В ходе исследования установлено, что биологически активные вещества (БАВ) – триптофан, цинка аспартат, аргинин, татиацин, таурин – оказывают дозозависимое влияние на метаболическую активность бактерий в планктонной форме. Суточная инкубация бактерий в присутствии высокой концентрации БАВ (1200–20 000 мкг/мл) приводила к снижению их количества, в концентрации 600–300 мкг/мл ингибирующий эффект не проявлялся, 150 мкг/мл – способствовала росту штаммов *E. coli*. Такая же тенденция наблюдалась в отношении бактерий в составе биопленок: цинка аспартат в концентрации 2500 мкг/мл оказывал бактерицидное влияние на *S. aureus* и *E. Coli*. Это позволяет рассматривать БАВ в качестве вспомогательных веществ для повышения эффективности антибактериальных препаратов и указывает на необходимость дальнейшего изучения более широкого круга низкомолекулярных соединений.

Ключевые слова: биологически активные вещества, антибактериальный эффект, *S. aureus*, *E. coli*, планктонные формы, микробные биопленки.

Для цитирования: Артюх Т., Сидорович Е., Островская О. Влияние аминокислот и солей цинка на кинетику роста бактерий рода *Escherichia* и *Staphylococcus* // Наука и инновации. 2022. №12. С. 73–80.
<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-12-73-80>

В последние годы изучение микробиома быстро прогрессировало – от поиска взаимосвязей между ним и его хозяином до понимания его роли в развитии заболеваний. С одной стороны, инвазия микроорганизмов сопровождается выбросом в ткани медиаторов и продуктов распада бактерий, которые стимулируют иммунную систему с выделением провоспалительных цитокинов. С другой – микроорганизмы и клетки человека используют одинаковые питательные субстраты, метаболизируя их до схожих продуктов. Бактерии синтезируют или расщепляют доступные в среде хозяина белки до аминокислот, в то же время хозяин использует их для поддержания гомеостаза [1].

Аминокислоты – структурные компоненты клеточной стенки бактерий, регулирующие ее ремоделирование в стационарной фазе [2]. В их присутствии наиболее эффективно осуществляется регуляция псевдопротеазами прорастания спор [3]. Недавние исследования показали большую роль систем межклеточной коммуникации в развитии инфекционных процессов [4]. Известно, что пептиды, входящие в состав межклеточной микробной системы коммуникации – quorum sensing (QS), состоят из различных аминокислот, таких как триптофан, серин, тирозин, изолейцин, лейцин, цистеин, треонин, глутаминовая кислота, глицин, фенилаланин, пролин и валин. Пептиды-аутоиндукторы

грамположительных бактерий играют ключевую роль в контроле различных микробных свойств, таких как образование биопленки, устойчивость к противомикробным препаратам и др. [5]. Помимо этого D-аминокислоты вызывают диспергирование биопленки в стареющих бактериальных сообществах [6]. Таким образом, микроорганизмы используют аминокислоты в качестве источника питательных веществ и энергии для своего выживания.

Интересный биологический парадокс состоит в том, что именно аминокислоты рассматриваются в качестве соединений с большим потенциалом в процессе разработки антибактериальных препаратов [7]. В частности, D-аминокислоты, как сообщается, проявляют прямую антимикробную активность широкого спектра действия. Мишенью для них, как и для многих антибиотиков, служит пептидогликан клеточной стенки [8]. Также было показано, что различия во включении бактериями D-аминокислот в пептидогликан могут зависеть от условий роста и влиять на скорость синтеза клеточной стенки [2]. Стратегии по снижению устойчивости к противомикробным препаратам направлены на разработку соединений, препятствующих восприятию пептидов QS, последующее ингибирование путей биосинтеза компонентов систем межклеточных коммуникаций и снижение биопленочной активности [9, 10].

Настоящее исследование направлено на определение и сравнительный анализ эффектов биологически активных соединений (триптофана, цинка, аргинина, татицина, таурина)

в диапазоне концентраций 150–20 000 мкг/мл на рост *S. aureus* и *E. coli*; анализ их влияния на метаболическую активность планктонных форм микроорганизмов в динамике и эффектов данных соединений на микроорганизмы в составе биопленок.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись грамположительные и грамотрицательные изоляты: 4 штамма *Escherichia coli* и 4 – *Staphylococcus aureus*, выделенные у пациентов хирургического профиля. Идентификация и типирование микроорганизмов производились на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы BioMérieux. Эффекты данных соединений изучали на планктонных формах микроорганизмов и на микроорганизмах в составе моно- и микстбиопленок в присутствии триптофана, цинка аспартата (массовая доля цинка не менее 27,5%), цинка хлорида (массовая доля цинка не менее 48%), аргинина, татицина (композиция аминокислот), таурина производства Института физико-органической химии НАН Беларуси. Рабочие растворы готовили с использованием жидкой питательной среды Мюллера-Хинтона. Концентрацию рассчитывали исходя из необходимой максимальной в ряду двойных разведений.

Эффекты исследуемых соединений в диапазоне 150–20 000 мкг/мл по отношению к микроорганизмам в планктонной форме определяли методом серийных разведений в бульоне с помощью «time-kill» анализа с подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) [11].

Из рабочих растворов готовили ряд двойных разведений:

20 000–150 мкг/мл для каждого соединения с постановкой контролей бактерий, бульона и веществ. Для инокуляции использовали суточную культуру микроорганизмов, выращенную на скошенном мясопептонном агаре в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл или 0,5 ед. по Мак-Фарланду (ед. МкФ), разведенную в 100 раз. Конечная концентрация бактерий в каждой пробирке, учитывая фактор разбавления питательной средой, составила приблизительно $7,5 \times 10^5$ КОЕ/мл. Пробирки инкубировали в обычной атмосфере при температуре 35 ± 1 °C в течение 24 ч. Для определения роста микроорганизмов измеряли оптическую плотность растворов на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan до и после инкубации. Результаты бактериального роста выражали как разность между вторым и первым замером в ед. МкФ. Также проводили посев из пробирок на мясопептонный агар в чашки Петри для регистрации КОЕ и исключения возможной нежелательной мутности исследуемых соединений. Экспозиция 24 ч при 35 ± 1 °C.

Эффекты соединений (2500–300 мкг/мл) по отношению к микроорганизмам в составе биопленки определяли микрометодом разведения веществ с применением индикатора (аламаровый синий 0,1%), также проводили визуализацию биопленок с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 KV [12]. Биопленки выращивали в системе иммунологических планшетов

в статических условиях 5 сут. при 35 ± 1 °С по адаптированной методике [13]. В первые сутки в каждую лунку вносили 200 мкл питательного бульона Мюллера-Хинтона, 20 мкл взвеси микроорганизмов (0,5 ед. МкФ) и медные сеточки, в последующем используемые для электронной микроскопии. Сеточки диаметром 3,5 мм предварительно покрывали формваровой пленкой. На четвертые сутки культивирования добавляли исследуемые соединения (2500–600 мкг/мл) и продолжали инкубировать. На пятые извлекали медные сеточки и добавляли индикатор во все лунки по 20 мкл. Регистрировали изменение окраски опытных образцов в сравнении с контрольными в динамике времени через 2, 4, 8, 16 и 24 ч.

Анализ и визуализацию данных проводили с помощью программного пакета Statistica Version 13.5.0.17. Сравнение результатов между группами исследуемых веществ осуществляли с помощью дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с постобработкой критерием Данна. Зависимость бактериального роста от концентраций исследуемых веществ проверяли анализом ANOVA.

Результаты и обсуждение

Эффекты присутствия в среде БАВ по отношению к планктонным формам микроорганизмов

Микроорганизмы, в отношении которых тестировали эффекты БАВ, имеют различную структуру клеточной стенки [14]. Однако средние значения роста между грамположительными штаммами

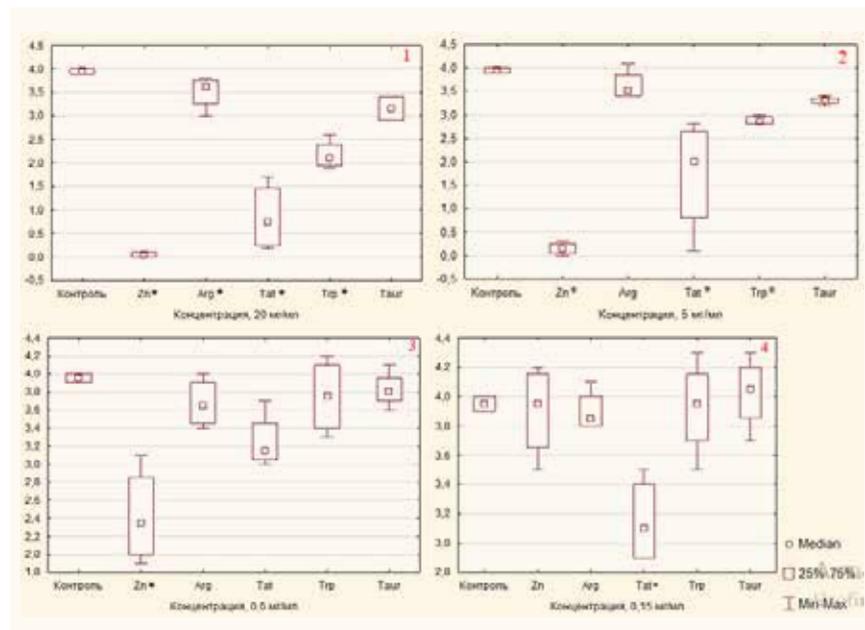


Рис. 1. Диаграммы размаха средних величин суточного роста *E. coli* и *S. aureus* в зависимости от концентрации воздействующих веществ с результатами анализа Краскела-Уоллиса: 1 – $N=22,17$, $df=5$, $p=0,0005$; 2 – $N=21,33$, $df=5$, $p=0,0007$; 3 – $N=15,10$, $df=5$, $p=0,0010$; 4 – $N=9,98$, $df=5$, $p=0,0758$

* – данные достоверны по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

S. aureus и грамотрицательными штаммами *E. coli* в присутствии исследуемых соединений статистически значимо не различались ($t=0,54$; $df=34$; $p=0,85$).

Достоверные изменения наблюдали для всех групп соединений по сравнению с контрольной (рис. 1). Парным сравнением средних рангов (критерий Данна) выявлены

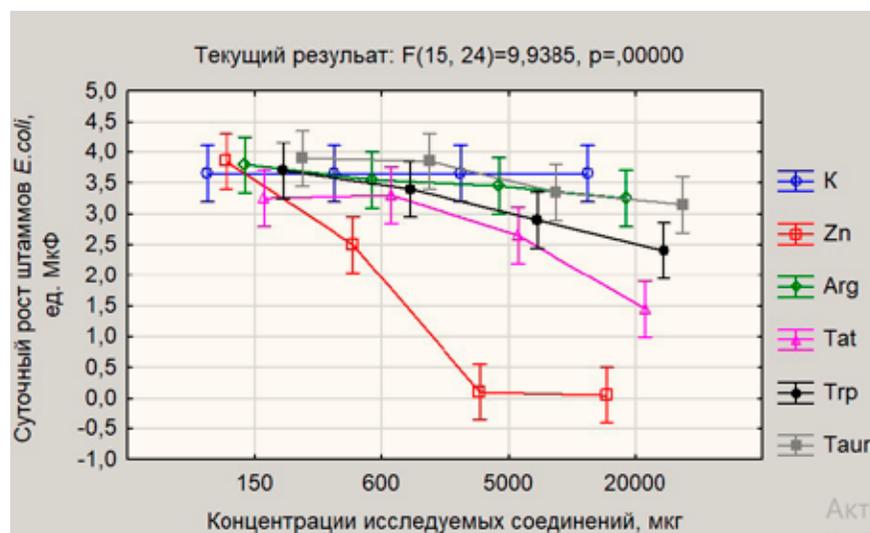


Рис. 2. График, отражающий суточный рост культур *E. coli* в присутствии БАВ в концентрации 150–20 000 мкг/мл ($p \leq 0,05$)

Вещество/ Группа	Стартовое С мкг/мл количество КОЕ/мл	12 ч	24 ч	48 ч	№	
Контроль	–	75×10 ⁶	975±15×10 ⁶	1095±45×10 ⁶	1305±15×10 ⁶	4
Zn asp	20000*#	75×10 ⁶	0 [#]	15±15×10 ⁶ #	15±15×10 ⁶ #	4
	5000*#	75×10 ⁶	15±15×10 ⁶ #	30±15×10 ⁶ #	45±15×10 ⁶ #	4
	600*#	75×10 ⁶	720±90×10 ⁶ #	750±180×10 ⁶ #	675±45×10 ⁶ #	4
	150*#ψ	75×10 ⁶	720±15×10 ⁶ #	1155±180×10 ⁶ ψ	1095±105×10 ⁶ #	4
Arg	20000*#	75×10 ⁶	795±15×10 ⁶ #	975±75×10 ⁶ #	1170±60×10 ⁶ #	4
	5000*#	75×10 ⁶	885±15×10 ⁶ #	1035±75×10 ⁶ #	1230±0×10 ⁶ #	4
	600*#	75×10 ⁶	870±0×10 ⁶ #	1065±15×10 ⁶ #	1215±45×10 ⁶ #	4
	150*ψ	75×10 ⁶	1035±75×10 ⁶ ψ	1140±0×10 ⁶ ψ	1380±60×10 ⁶ ψ	4
Tat	20000*#	75×10 ⁶	360±60×10 ⁶ #	435±75×10 ⁶ #	735±75×10 ⁶ #	4
	5000*#	75×10 ⁶	690±30×10 ⁶ #	795±45×10 ⁶ #	900±30×10 ⁶ #	4
	600*#	75×10 ⁶	960±90×10 ⁶ #	990±120×10 ⁶ #	1125±135×10 ⁶ #	4
	150*#	75×10 ⁶	810±30×10 ⁶ #	975±15×10 ⁶ #	1050±0×10 ⁶ #	4
Trp	20000*#	75×10 ⁶	630±60×10 ⁶ #	720±60×10 ⁶ #	690±30×10 ⁶ #	4
	5000*#	75×10 ⁶	750±30×10 ⁶ #	870±60×10 ⁶ #	945±15×10 ⁶ #	4
	600*#	75×10 ⁶	900±30×10 ⁶ #	1020±60×10 ⁶ #	1110±30×10 ⁶ #	4
	150*#ψ	75×10 ⁶	1035±15×10 ⁶ ψ	1110±60×10 ⁶ ψ	1170±90×10 ⁶ #	4
Taur	20000*#	75×10 ⁶	825±15×10 ⁶ #	945±75×10 ⁶ #	960±60×10 ⁶ #	4
	5000*#	75×10 ⁶	855±15×10 ⁶ #	1005±15×10 ⁶ #	1110±90×10 ⁶ #	4
	600*#ψ	75×10 ⁶	990±60×10 ⁶ #	1155±75×10 ⁶ ψ	1230±0×10 ⁶ #	4
	150*#ψ	75×10 ⁶	1005±45×10 ⁶ ψ	1170±60×10 ⁶ ψ	1200±60×10 ⁶ #	4

Таблица 1. Средние значения КОЕ штаммов *E. coli* в присутствии БАВ в динамике времени ($p \leq 0,05$)

Примечание: большой размах стандартного отклонения комментируется различными штаммами кишечной палочки; значимые различия относительно контрольной группы * – $p < 0,05$; # – ингибирующий эффект препарата относительно контрольной группы, ψ – стимулирующий эффект препарата относительно контрольной группы

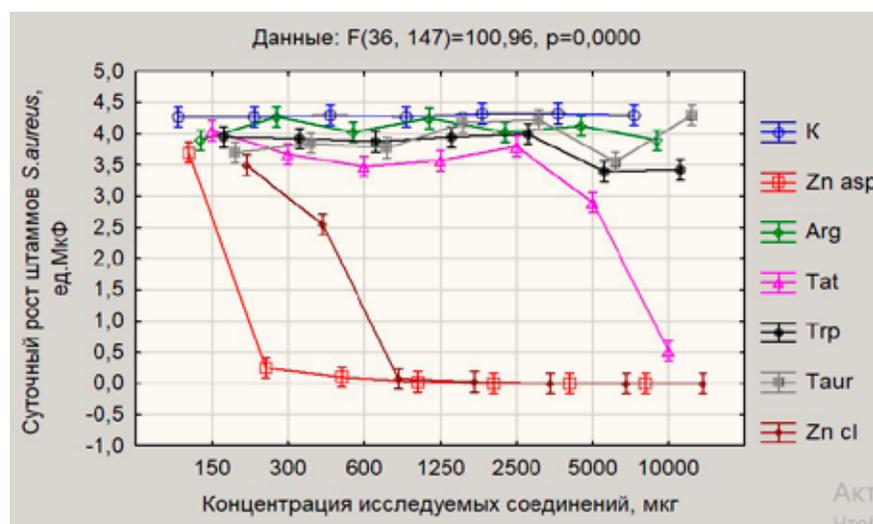


Рис. 3. График, отражающий суточный рост культур *S. aureus* в присутствии БАВ в концентрации 150–10 000 мкг/мл ($p \leq 0,05$)

статистически значимо различающиеся показатели роста микроорганизмов для следующих пар групп во всех исследуемых концентрациях: $P(\text{Zn-K})=0,0000$; $P(\text{Tat-K})=0,0005$; $P(\text{Arg-Zn})=0,0000$; $P(\text{Trp-Zn})=0,0002$; $P(\text{Taur-Zn})=0,0000$; $P(\text{Taur-Tat})=0,0038$.

На основании результатов, представленных на рис. 2 и в табл. 1, рассчитан процент увеличения или уменьшения роста микроорганизмов от контрольного значения роста *E. coli* через сутки инкубирования в присутствии цинка аспартата, аргинина, татицина, триптофана, таурина.

Присутствие в среде:

- 20 мг/мл цинка аспартата снижало показатели суточного роста *E. coli* на 98,6%; 5 мг/мл – уменьшило КОЕ на 97,3%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 31,5%; 0,15 мг/мл – способствовало небольшому увеличению роста *E. coli*, до 5,5% от контрольного значения;
- 20 мг/мл аргинина снижало показатели суточного роста *E. coli* на 10,9%; 5 мг/мл – уменьшило КОЕ на 5,5%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 2,8%; 0,15 мг/мл – способствовало увеличению роста *E. coli* до 4,1%;
- 20 мг/мл композиции аминокислот – татицина снижало показатели суточного роста *E. coli* на 60,3%; 5 мг/мл – привело к уменьшению КОЕ на 27,4%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 9,6%; 0,15 мг/мл татицина также сдерживало рост *E. coli* до 10,7%;
- 20 мг/мл триптофана снижало показатели суточного роста *E. coli* на 34,3%; 5 мг/мл – уменьшало КОЕ на 20,6%; 0,6 мг/мл – ингиби-

ровало рост бактерий на 6,9%; 0,15 мг/мл – способствовало увеличению роста *E. coli* до 1,6%;
 - 20 мг/мл таурина снижало показатели суточного роста *E. coli* на 13,7%; присутствие 5 мг/мл – привело к падению КОЕ на 8,2%; 0,6 мг/мл – увеличивало рост бактерий на 5,5%; 0,15 мг/мл – способствовало увеличению роста *E. coli* до 6,9%.

Таким образом, цинка аспарат, аргинин, татицина, триптофан и таурин в концентрации от 20 мг/мл до 5 мг/мл задерживают рост *E. coli*, а в концентрации 0,6 мг/мл и 0,15 мг/мл – напротив, способствуют росту кишечной палочки.

«Time-kill» анализ показал, что выявленные эффекты БАВ на рост микроорганизмов наблюдались после 4 ч присутствия соединений в среде и продолжались до 48 ч. Наиболее выражено они наблюдались в промежутке 16–24 ч. инкубации в сравнении с контролем ($p < 0,001$).

На основании результатов, представленных на рис. 3 и в табл. 2, рассчитан процент увеличения или уменьшения роста микроорганизмов от контрольного значения *S. aureus* через сутки инкубирования в присутствии исследуемых соединений.

Присутствие в среде:

- 10 мг/мл цинка аспартата уменьшало показатели суточного роста *S. aureus* на 100%; 2,5 мг/мл – сокращало КОЕ на 100%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 100%; 0,15 мг/мл – снизило рост *S. aureus* до 26,0% от контрольного значения;

- 10 мг/мл аргинина уменьшило показатели суточного роста *S. aureus* на 21,7%; 2,5 мг/мл – сократило КОЕ

Вещество/Группа	С мкг/мл	Стартовое количество КОЕ/мл	12 ч	24 ч	48 ч	№
Контроль	–	75×10 ⁶	1170±15×10 ⁶	1290±15×10 ⁶	1425±30×10 ⁶	4
Zn asp	10000* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	0 [#]	0 [#]	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	0 [#]	0 [#]	4
	600* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	0±30×10 ^{6#}	0±60×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	954±45×10 ^{6#}	1125±90×10 ^{6#}	1215±90×10 ^{6#}	4
Arg	10000* [#]	75×10 ⁶	1010±170×10 ^{6#}	1285±130×10 ^{6#}	1160±30×10 ^{6#}	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	1125±45×10 ^{6#}	1200±120×10 ^{6#}	1260±120×10 ^{6#}	4
	600* [#]	75×10 ⁶	1010±0×10 ^{6#}	1215±30×10 ^{6#}	1335±30×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	1050±30×10 ^{6#}	1170±0×10 ^{6#}	1275±90×10 ^{6#}	4
Tat	10000* [#]	75×10 ⁶	45±45×10 ^{6#}	105±90×10 ^{6#}	135±90×10 ^{6#}	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	990±0×10 ^{6#}	1140±60×10 ^{6#}	1275±30×10 ^{6#}	4
	600* [#]	75×10 ⁶	975±45×10 ^{6#}	1065±30×10 ^{6#}	1140±30×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	1080±30×10 ^{6#}	1155±90×10 ^{6#}	1290±60×10 ^{6#}	4
Trp	10000* [#]	75×10 ⁶	930±90×10 ^{6#}	990±140×10 ^{6#}	1140±90×10 ^{6#}	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	1020±120×10 ^{6#}	1215±90×10 ^{6#}	1290±60×10 ^{6#}	4
	600* [#]	75×10 ⁶	1065±45×10 ^{6#}	1170±60×10 ^{6#}	1260±120×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	1050±60×10 ^{6#}	1185±90×10 ^{6#}	1320±120×10 ^{6#}	4
Taur	10000* [#]	75×10 ⁶	960±0×10 ^{6#}	990±60×10 ^{6#}	1440±60×10 ^{6#}	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	995±15×10 ^{6#}	1110±60×10 ^{6#}	1380±60×10 ^{6#}	4
	600* [#]	75×10 ⁶	1020±0×10 ^{6#}	1140±60×10 ^{6#}	1260±120×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	1100±0×10 ^{6#}	1260±60×10 ^{6#}	1260±120×10 ^{6#}	4
Zn cl	10000* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	0 [#]	0 [#]	4
	2500* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	0 [#]	0 [#]	4
	600* [#]	75×10 ⁶	0 [#]	15±30×10 ^{6#}	45±30×10 ^{6#}	4
	150* [#]	75×10 ⁶	900±30×10 ^{6#}	1065±90×10 ^{6#}	1140±60×10 ^{6#}	4

Таблица 2. Средние значения КОЕ *S. aureus* в присутствии БАВ в динамике времени ($p \leq 0,05$)

Примечание: большой размах стандартного отклонения объясняется различными штаммами стафилококка; значимые различия относительно контрольной группы * – $p < 0,05$; # – ингибирующий эффект препарата относительно контрольной группы

на 12,8%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 21,7%; 0,15 мг/мл также способствовало уменьшению роста *S. aureus* до 18,6% от контрольного значения;
 - 10 мг/мл татицина снижало показатели суточного роста *S. aureus* на 96,5%; 2,5 мг/мл – сократило КОЕ на 19,8%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 21,7%; 0,15 мг/мл – снизило рост *S. aureus* до 18,6% от контрольного значения;

- 10 мг/мл триптофана уменьшало показатели суточного роста *S. aureus* на 23,3%; 2,5 мг/мл – сократило КОЕ на 17,3%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 24,4%; 0,15 мг/мл – снизило рост *S. aureus* до 18,6% от контрольного значения;
 - 10 мг/мл таурина уменьшало показатели суточного роста *S. aureus* на 23,3%; 2,5 мг/мл – сократило КОЕ на 14,0%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий

Состав биопленки	Контроль (без веществ)	1. Цинка аспарат 2500/1200/600 мкг/мл	2. Триптофан 2500/1200/600 мкг/мл	3. Аргинин 2500/1200/600 мкг/мл
N	3	3	3	3
8 ч инкубирования				
<i>S. aureus</i>	P	C*/C*/C*	C*/C*/P#	C*/P#/P#
<i>E. coli</i>	P	C*/C*/C*	C*/C*/P#	C*/P#/P#
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	P	C*/C*/C*	C*/C*/P#	C*/P#/P#
16 ч инкубирования				
<i>S. aureus</i>	P	C*/C*/P#	C*/P#/P#	C*/P#/P#
<i>E. coli</i>	P	C*/C*/P#	C*/P#/P#	P#/P#/P#
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	P	C*/C*/P#	C*/P#/P#	P#/P#/P#
24 часов инкубирования				
<i>S. aureus</i>	P	C*/P#/P#	P#/P#/P#	P#/P#/P#
<i>E. coli</i>	P	C*/P#/P#	P#/P#/P#	P#/P#/P#
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	P	P/P/P	P/P/P	P/P/P

Таблица 3. Результаты индикаторного анализа на основе резазурина по отношению к биопленкам *S. aureus* и *E. coli*

Примечание: P – розовый цвет; C – синий цвет; достоверные изменения в сравнении с контролем (*); достоверные изменения между группами 1, 2, 3 мкг/мл (#)

на 11,6%; 0,15 мг/мл – снизило рост *S. aureus* до 2,3% от контрольного значения ($p < 0,05$);

- 10 мг/мл цинка хлорида уменьшало показатели суточного роста *S. aureus* на 100%; 2,5 мг/мл – сократило КОЕ на 100%; 0,6 мг/мл – ингибировало рост бактерий на 98,8%; 0,15 мг/мл – снизило рост *S. aureus* до 30,2% от контрольного значения ($p < 0,05$).

Таким образом присутствие в среде цинка (С8Н12N2O8Zn, ZnCl2), аргинина, татипацина, триптофана и таурина в концентрации от 10 мг/мл до 5 мг/мл задерживает рост штаммов *S. aureus*, а в концентрации 0,6 мг/мл и 0,15 мг/мл в меньшей степени снижают количество стафилококков, но в отличие от эффектов на *E. coli* не оказывают стимулирующего воздействия на метаболизм *S. aureus*.

Выявленные эффекты БАВ на рост микроорганизмов,

согласно «time-kill» анализу, наблюдались после 4 ч присутствия соединений в среде и продолжались до 48 ч. Наиболее выражены они были в промежутке 16–24 ч инкубации ($p < 0,001$). После 36 ч воздействия показатели бактериального роста для всех исследуемых веществ приближались к контрольной группе. Данные, полученные при проведении анализа «time-kill», подтвердили результаты метода макроразведений в бульоне о том, что высокие концентрации БАВ сдерживают рост *S. aureus* и *E. coli*, а низкие – напротив, способствуют повышению метаболизма, что установлено для *E. coli*. Эти сведения соответствуют исследованию о способности кишечной палочки утилизировать 7 из 20 аминокислот в равномолярной смеси без других источников углерода или азота [15].

Эффекты БАВ на микробные биопленки

В результате бактериостатического действия исследуемых веществ на биопленку микроорганизмы не проявляют жизнедеятельности, при этом цвет резазурина не изменяется (синий). При устойчивости микроорганизма к препарату индикатор становится розовым, так как в живых клетках митохондрии способны уменьшать количество растворенного субстрата с формированием водорастворимого ярко-розового красителя. Таким образом, скорость изменения окраски опытных образцов в сравнении с контрольными пропорциональна количеству метаболически активных клеток [16] (табл. 3).

По результатам индикаторного анализа (табл. 3) видно, что в первые 8 ч инкубирования цинка аспарат обладает ингибирующим действием по отношению к моно- и микстбиопленкам в концентрации 600–2500 мкг/мл; триптофан ингибирует рост моно- и микстбиопленки в концентрации 1200–2500 мкг/мл; аргинин действует таким же образом в концентрации 2500 мкг/мл. Через 16 ч антимикробная активность соединений снижается: цинка аспарат ингибирует рост моно- и микстбиопленки в концентрации 1200–2500 мкг/мл; триптофан – в концентрации

2500 мкг/мл; аргинин ингибирует рост монобиопленки только *S. aureus* в концентрации 2500 мкг/мл. Дополнительное ожидание в течение 24 ч при $35 \pm 1^\circ\text{C}$ требуется для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) веществ. Спустя сутки среди всех БАВ только

цинка аспарат в концентрации 2500 мкг/мл сохранял ингибирующий эффект на *S. aureus* и *E. coli* (табл. 3). Бактерии в составе микстбиопленок были устойчивы ко всем исследуемым соединениям. Эти данные также подтверждаются и другими исследованиями [17].

Электронно-микроскопическое изучение микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* продемонстрировало их способность к образованию биопленок (рис. 4).

При микроскопии наблюдали образование электронноплотных структур с большим количеством бактерий, адгезированных к поверхности формваровой пленки и друг к другу (рис. 4).

Клетки в биопленке объединены рыхлым внеклеточным веществом (экзополисахаридным матриксом). Его наличие и адгезия указывают на необратимую стадию образования микробной биопленки и являются морфологическим признаком истинной биопленки в отличие от колоний микроорганизмов на агаре [18]. В то же время на образцах, которые культивировали в присутствии 2500 мкг/мл цинка аспартата (рис. 4–3), видны признаки обширного разрушения биопленки и отсутствие экзополисахаридного матрикса по сравнению с контрольными образцами (рис. 4–1), а также образцами, подвергшимися воздействию цинка аспартата в меньших концентрациях (рис. 4–2). При микроскопии

пятидневных образцов моно- и микстбиопленок, культивируемых в присутствии триптофана 2500–600 мкг/мл и аргинина 2500–600 мкг/мл, существенных отличий по сравнению с кон-

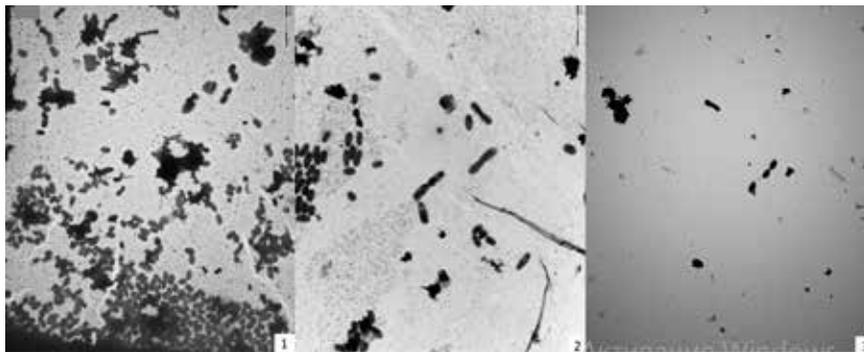


Рис. 4. Образцы 5-дневных монобиопленок; 1 – *E. coli*; 2 – *E. coli* + цинка аспарат 1200 мкг/мл; 3 – *E. coli* + цинка аспарат 2500 мкг/мл; мерный отрезок равен 10 мкм

трольными образцами выявлено не было. Полученные данные об эффектах БАВ на биопленки *S. aureus* и *E. coli* с использованием ТЭМ коррелируют с результатами индикаторного метода после 24-часового инкубирования (рис. 4, табл. 3).

При сравнительном анализе ингибирующих концентраций БАВ для планктонных форм и биопленок видно, что для них соответствующий эффект цинка аспартата наблюдается в концентрации 600 мкг/мл (табл. 1, 2), для биопленок ингибирование наступает в присутствии 2500 мкг/мл (табл. 3). При сравнении ингибирующих концентраций цинка аспартата для микроорганизмов в планктонной форме и в составе биопленок видно, что МИК для биопленки возрастает приблизительно в 4 раза относительно МИК для планктонных форм (табл. 1–3). Одним из клинически значимых свойств бактерий в составе биопленок является более высокая устойчивость к антибиотикам в сравнении с их свободно живущими аналогами. В связи с гетерогенностью консорциума механизмы, отвечающие за резистентность, функционируют в биопленке одновременно, обеспечивая высокие уровни антибиотикоре-

зистентности. Они в корне отличаются от механизмов устойчивости, используемых планктонными клетками [17]. Универсальный подход, с помощью которого аминокислоты препятствуют образованию/разрушают биопленки, маловероятен. Ингибирующие эффекты БАВ могут реализовываться через блокирование синтеза клеточных элементов, нарушение синтеза или разрушение полимерного матрикса, дезорганизацию межклеточного обмена генетической информацией, могут быть направлены на механизмы первоначальной адгезии бактерий к абиотической поверхности, а также сочетаться с собственно бактерицидными агентами (антибиотиками) [19].

Необходимо проведение дальнейших исследований для выявления механизмов действия БАВ и изучения их комбинаций с антибактериальными препаратами с целью поиска синергии. Интерес могут представлять как высокие концентрации веществ, обладающие ингибирующими свойствами, так и те, что стимулируют рост бактерий (табл. 1). Так как до воздействия антибиотика клетки-персисторы находятся в состоянии замедленного метаболизма, это позволяет им

в некоторых случаях предотвратить повреждение клеточной мишени антибиотиком. Предварительное инкубирование бактерий с БАВ в концентрации 150 мкг/мл и ниже способно активизировать метаболизм клеток, проявляющих свойства персистенции [20]. С одной стороны БАВ необходимы для роста и метаболизма микроорганизмов, а с другой – тщательная оптимизация состава и концентрации может оказывать и антибактериальный, и антибиопленочный эффект.

Выводы

Присутствие в среде триптофана, цинка, аргинина, татицина, таурина в концентрации 1200–20 000 мкг/мл приводит к снижению количества планктонных форм бактерий и деградации биопленок. Низкие концентрации БАВ (150–600 мкг/мл) оказывают модулирующие эффекты на метаболизм микроорганизмов в различных формах существования. Изменения в доступности питательных веществ (БАВ) влияют на качественный и количественный состав микробиома, а также на экспрессию факторов вирулентности, степень патогенности бактерий, их способность к генетической трансформации и образованию клеток-персисторов. Модулирующие эффекты БАВ позволяют рассматривать их в качестве адъювантов/вспомогательных веществ для повышения эффективности антибактериальных препаратов, что может привести к улучшению клинических результатов и снижению распространения антибиотикоустойчивости. ■

- **Summary.** Biologically active substances (BAS) (tryptophan, zinc aspartate, arginine, tatipacin, taurine) have modulating effects on the metabolism of microorganisms in vitro. The study found that biologically active substances have dose-dependent effects on the metabolic activity of bacteria in planktonic form. Daily incubation of bacteria in the presence of a high concentration of biologically active substances (1200–20 000 µg/ml) led to a decrease in the number of planktonic forms. BAS concentrations in the range of 600–150 µg/ml did not have an inhibitory effect on microorganisms. All test substances at a concentration of 150 µg/ml promoted the growth of *E. coli* strains. Dose-dependent effects of biologically active substances were also observed in relation to bacteria in biofilms. Zinc aspartate at a concentration of 2500 µg/ml has a bactericidal effect on *S. aureus* and *E. coli* in monobiofilms. The identity of metabolic flows leads to competition between body cells and microorganisms for nutrient substrates, which is important in the development of the infectious process, and also indicates the need to study the effects of biologically active substances in animal models.
- **Keywords:** biologically active substances, antibacterial effect, *S. aureus*, *E. coli*, planktonic forms, microbial biofilms.
- <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-12-73-80>

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. D. N. Lesperance. Microbiomes as modulators of *Drosophila melanogaster* homeostasis and disease / D. N. Lesperance, N. A. Broderick // *Curr Opin Insect Sci*. 2020. Vol. 39. P. 84–90.
2. T. Miyamoto. D-Amino acid metabolism in bacteria / T. Miyamoto, H. Homma // *J Biochem*. 2021. Vol. 170, N.1. P. 5–13.
3. A. J. Lawler. A Revised Understanding of *Clostridioides difficile* Spore Germination / A. J. Lawler [et al.] // *Trends Microbiol*. 2020. Vol. 28, N.9. P. 744–752.
4. G. Coquant. Gossip in the gut: Quorum sensing, a new player in the host-microbiota interactions / G. Coquant [et al.] // *World J Gastroenterol*. 2021. Vol. 27, N.42. P. 7247–7270.
5. Y. Huang. The Roles of Microbial Cell-Cell Chemical Communication Systems in the Modulation of Antimicrobial Resistance / Y. Huang [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. 2020. Vol. 9, N.11. P. 779.
6. T. Miyamoto. Involvement of penicillin-binding proteins in the metabolism of a bacterial peptidoglycan containing a non-canonical D-amino acid / T. Miyamoto [et al.] // *Amino Acids*. 2020. Vol. 52, N.3. P. 487–497.
7. P. Cardoso. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities acid / P. Cardoso [et al.] // *Biophys Rev*. 2021. Vol. 13, N.1. P. 35–69.
8. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling / A. Egan [et al.] // *Nature reviews microbiology*. 2020. Vol. 18. P. 446–460.
9. M. Kumar. Recent Breakthroughs in Various Antimicrobial Resistance Induced Quorum Sensing Biosynthetic Pathway Mediated Targets and Design of their Inhibitors / M. Kumar [et al.] // *Comb Chem High Throughput Screen*. 2020. Vol. 23, N.6. P. 458–476.
10. Т. В. Артюх. Изменение чувствительности грамположительных микроорганизмов к доксициклину в присутствии цинка аспартата и триптофана / Т. В. Артюх, В. М. Шейбак, О. Б. Островская // *Вестн. Смоленской МА*. 2022. Т. 20, №1. С. 46–54.
11. A. P. MacGowan. A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative β -lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone / A. P. MacGowan [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1996. Vol. 38. P. 193–203.
12. Т. В. Артюх. Современные способы исследования микробных биопленок кишечника / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, В. М. Шейбак // *Гепатология и гастроэнтерология*. 2021. Т. 5, №1. С. 30–36.
13. M. D. Macià. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria / M. D. Macià, E. Rojo, A. Oliver // *Clin Microbiol Infect*. 2014. Vol. 20, N.10. P. 981–90.
14. G. K. Auer. Bacterial Cell Mechanics / G. K. Auer, D. B. Weibel // *Biochemistry*. 2017. Vol. 56, N.29. P. 3710–3724.
15. Relation between chemotaxis and consumption of amino acids in bacteria / Y. Yang [et al.] // *Mol Microbiol*. 2015. Vol. 96, N.6. P. 1272–1282.
16. Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms / F. Driessche [et al.] // *Journal of Microbiological Methods*. 2014. V. 98. P. 31–34.
17. Т. В. Артюх. Особенности резистентности клинических изолятов *E. coli* и *C. albicans* образующих биопленку / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, О. Б. Островская // *Вестн. ВГМУ*. 2021. Т. 20, №1. С. 46–54.
18. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования: учебн. пособие / А. М. Марданова [и др.]; под ред. О. Н. Ильинской. – Казань, 2016.
19. C. Beloin. Speciality Grand Challenge for “Biofilms” / C. Beloin, D. McDougald // *Front Cell Infect Microbiol*. 2021. Vol. 11 // <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7937965/>.
20. Т. В. Артюх. Персистенция как механизм устойчивости к антибактериальным препаратам / Т. В. Артюх, Т. Н. Соколова, Е. А. Сидорович // *Актуальные вопросы микробиологии, инфектологии и иммунологии: сборник материалов межвузовской научно-практической конференции.* – Гродно, 2021.

Статья поступила в редакцию 06.04.2022 г.