

УДК 579.66

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ ANABAENA SPHAERICA BORN. ET FLAH. IPPAS B-404

М.С. Темнов, Я.В. Устинская, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий

ФГБОУ ВПО «Тамбовский государственный технический университет», Тамбов, Россия

Введение

Цианобактерии представляют собой граммотрицательные оксигенные фотосинтезирующие бактерии, которые обитают на Земле 2,8 млрд лет и способствуют изменениям в геохимии и биологии нашей планеты [1]. Эти микроорганизмы встречаются в различных экологических нишах: водные экосистемы, пустыни, полярные регионы, пещеры и даже в симбиозе с другими организмами, такими как грибы, с образованием, например, лишайников. Цианобактерии сформировали современную атмосферу Земли, обогатив ее кислородом за счет оксигенного фотосинтеза [2, 3], но при этом они также могут наносить значительный вред экосистемам из-за токсического цветения, в процессе которого они выделяют токсины различной природы, вызывающие гибель многих организмов [4]. В настоящее время активно изучаются биоактивные соединения цианобактерий, обнаружено более 1100 биологически активных метаболитов этих микроорганизмов [5]. Биологически активные соединения цианобактерий, ингибирующие рост, развитие и жизнеспособность различных организмов, могут найти применение в фармацевтике, например, в качестве противовирусных и антибактериальных соединений. В настоящее время ученые активно интересуются этими микроорганизмами – потенциальными продуцентами новых антибиотиков. Поиск новых продуцентов антибиотических веществ актуален в связи с увеличением устойчивости бактерий к используемым в настоящее время антибиотическим веществам [6]. Одним из наиболее перспективных продуцентов антибиотических веществ считается род цианобактерий *Anabaena* [7]. В исследованиях [8, 9] было установлено, что липидные экстракты цианобактерий *Anabaena* проявляют антибактериальные свойства в отношении *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*.

Цель работы – исследование влияния условий культивирования на антибактериальные свойства в отношении грамположительных бактерий неполярных экстрактов экзо- и эндометаболитов цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404, определение минимальной ингибирующей концентрации этих экстрактов.

Материалы и методы

Культивирование штамма цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404, полученного из Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, осуществлялось в фотобиореакторе (5 л) при аэрации газовоздушной смесью с концентрацией углекислого газа 0,02 % (расход $(3 \pm 0,5)$ л/мин) на среде Заррука в течение 7 дней при температуре и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) согласно таблице 1.

Таблица 1 – Условия культивирования штамма *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404

Режим культивирования	ФАР, мкмоль фотонов/(м ² ·с)	Температура, °С
1	33±0,1	20±0,1
2	100±0,1	20±0,1
3	33±0,1	36±0,1
4	100±0,1	36±0,1

Отделение фугата от биомассы цианобактерий (образцы 1, 2, 3 и 4) осуществлялось с использованием центрифуги Sigma 2–16 PK/2–16P при скорости вращения 4000 об/мин в течение 10 минут.

Определение концентрации клеток цианобактерий в суспензии осуществлялось гравиметрическим методом: предварительно взвешенную пробирку наполняли сконцентрированной суспензией цианобактерий, затем помещали в сушильный шкаф при температуре 40 °С и сушили до постоянной массы ($\Delta = 0,01$ г.), затем взвешивали.

Сухую биомассу определяли по формуле:

$$M = (a-b)/V, \quad (1)$$

где M – сухая биомасса, г/мл; a – масса пробирки со сконцентрированной биомассой клеток микроводорослей, г; b – масса пробирки (фильтра) без осадка, г; V – объем культуральной жидкости, мл.

Полученная биомасса клеток влажностью 98–99 % делилась на образцы объемом по 25 мл и подвергалась дезинтеграции при воздействии ультразвука мощностью 150 Вт в течение 300 с. После чего дезинтегрированные клетки сушились до постоянной массы при температуре 40 °С ($\Delta = 0,01$ г.).

Экстракция неполярных соединений осуществлялась путем добавления к биомассе клеток микроводорослей петролейного эфира в соотношении 1 г биомассы : 50 мл петролейного эфира, экстракция осуществлялась в течение 8 часов с применением аппарата Сокслета. Определение массовой доли извлеченных липидов осуществлялось по формуле:

$$M_{\text{л}} = ((m_1 - m_2)/m_1) \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где $M_{\text{л}}$ – массовая доля извлеченных липидов, %; m_1 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей до экстракции, г; m_2 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей после экстракции, г.

Экстракция неполярных соединений из культуральной жидкости (КЖ) осуществлялась в аппарате с мешалкой (при скорости вращения мешалки 600 об/мин), температуре 40 °С в течение 3 ч с использованием в качестве экстрагента петролейного эфира (ПЭ) при соотношении 1,14 мл (КЖ) : 1 мл (ПЭ).

Полученные экстракты концентрировались с применением ротационного испарителя ИР-1МЗ.

Количественный состав неполярной фракции, извлеченной из культуральной жидкости, определялся методом тонкослойной хроматографии с применением в качестве подвижной фазы смеси петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90(об.) : 10(об.) : 1 (об.)) [10].

На втором этапе эксперимента на питательную среду МПА (толщина слоя агара в чашке $4 \pm 0,5$ мм), залитой в чашки Петри, вносилось 50 мкл грамположительных бактерий с концентрацией $99,9 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Далее в чашку Петри вносились диски, на которые было нанесено от 25 до 100 мкг неполярного экстракта экзо- или эндометаболитов цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404. Затем чашки Петри помещались в термостат на 20 ч при температуре 37 °С. Часть чашек Петри освещалась белым светом с уровнем ФАР = 100 ± 20 мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$), вторая часть чашек культивировалась в темноте. Положительный контроль во всех экспериментах – азитромицин – 15 мкг. Отрицательный контроль – петролейный эфир – 80 мкл. Величины зон ингибирования роста бактерий вокруг дисков с веществами, представленные в таблицах 3 и 4, представляют собой среднее арифметическое по результатам трех параллельных опытов. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС) экстракта неполярных веществ была определена с применением метода, описанного в [11].

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента показали, что условия культивирования оказывают значительное содержание на количество биомассы клеток и содержание неполярных соединений в культуральной жидкости и биомассе клеток *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404 (табл. 2).

Наибольшая концентрация биомассы клеток на 7 сутки культивирования $19,4$ г/л наблюдалась при росте штамма в условиях режима 4 (ФАР = $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$); температура = $36 \pm 0,1$ °С). Наиболее значительное накопление неполярных соединений (липидной природы) наблюдается в условиях культивирования режима 1 (ФАР = $33 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$); температура = $20 \pm 0,1$ °С), что связано, возможно, с тем, что данные условия культивирования являются стрессовыми для штамма и вызывают значительную перестройку метаболизма.

Таблица 2 – Результаты эксперименты по культивированию цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404

Параметры	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
Концентрация биомассы на 7 сутки, г/л	10,0	7,8	11,8	19,4
Неполярные соединения в КЖ (7 сутки), мг/л	431	80	169	178
Неполярные соединения в биомассе, % (масс.)	18,5	5,2	4,0	5,1

На втором этапе эксперимента исследовались антибактериальные свойства полученных экстрактов. Было определено, что все экстракты, содержащие неполярные вещества культуральной жидкости, обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету, так и в темноте (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ, извлеченных из культуральной жидкости цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404 (при $\alpha = 0,05$; $n=3$)

Количество экстракта на диске	Неполярные экстракты из культуральной жидкости <i>Anabaena sphaerica</i> Born. et Flah. IPPAS B-404			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота (ФАР= 0 мкмоль фотонов/(м ² ·с))			
1000 мкг	12,67±1,22	13,33±1,22	19,53±3,28	17,87±2,95
500 мкг	8,77±0,02	11,03±1,55	11,67±1,22	7,17±0,31
100 мкг	6,63±0,01	7,43±0,20	-	-
50 мкг	-	6,83±0,89	-	-
MIC, мкг/мл	90 (R ² =0,9)	41 (R ² =0,95)	330 (R ² =1)	462 (R ² =1)
Свет (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))				
	1000 мкг	28,67±4,90	23,67±1,22	21,37±1,48
	800 мкг	24,67±4,90	22,67±1,22	19,90±1,03
	600 мкг	22,67±4,90	19,33±4,90	19,07±1,81
	400 мкг	15,00±0,91	17,33±4,90	14,30±1,80
	200 мкг	14,67±1,22	15,33±4,90	8,33±1,22
	100 мкг	8,40±0,26	14,33±1,22	7,60±1,76
	50 мкг	7,33±1,22	6,67±1,22	-
	25 мкг	-	6,50±0,70	-
	MIC, мкг/мл	(R ² =0,9)	27 (R ² =0,95)	101 (R ² =0,95)
				131 (R ² =0,95)

Было установлено, что при дополнительном воздействии светового излучения повышается эффективность воздействия экстракта на грамположительные бактерии, величина минимальной ингибирующей концентрации уменьшается в 1,5–3,5 раза. Что можно объяснить, по-видимому, теорией перекисного окисления органических соединений Баха-Энглера, развитой в дальнейшем академиком Н.Н. Семеновым на основе разработанной им теории цепных реакций [12–14].

Поток фотонов инициирует окисление веществ липидной природы, что приводит к появлению липидных радикалов:



Липидные радикалы реагируют с O₂ с образованием пероксидных радикалов, которые взаимодействуют с новыми молекулами липидов



Образующие реакционные активные радикалы вызывают окисление жирных кислот, входящих в состав цитоплазматических мембран грамположительных бактерий, в то время как у цианобактерий гораздо лучше развита защита от подобных соединений, образующих в результате воздействия света, ведь эти организмы миллиарды лет используют световое излучение в качестве источника энергии и выработали способ защиты от его негативного воздействия (антиоксидантная система).

Такому окислению подвергаются в первую очередь вещества, содержащие ненасыщенные жирные кислоты. Причем их превращения могут идти как с разрывом двойной связи и образованием перекисей, так и без – по свободно-радикальному механизму. Насыщенные кислоты реагируют медленно и только по свободно-радикальному механизму. В связи с чем можно предположить, что экстракты, содержащие большее количество ненасыщенных жирных кислот, имеют меньшую минимальную ингибирующую концентрацию. Это подтверждается результатами эксперимента, как видно из таблицы 3, меньшую величину ингибирующей концентрации имеют образцы 1 и 2, культивируемые при пониженной температуре $20 \pm 0,1$ °C: для сохранения жизнеспособности клетки цианобактерий перестраивают метаболизм и синтезируют большое количество ненасыщенных жирных кислот, которые имеют более низкую температуру плавления и позволяют сохранить жизнеспособность клеткам (сохраняя жидким околочлеточное пространство и сохраняя жизнеспособность клеточной мембраны).

При этом, вероятно, в клетках *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404 содержатся липиды другого состава, из-за чего экстракты из биомассы обладают значительно менее выраженными ингибирующими свойствами в отношении грамположительных бактерий (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ, извлеченных из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404 (при $\alpha = 0,05$; $n=3$)

Количество экстракта на диске	Неполярные экстракты из биомассы <i>Anabaena sphaerica</i> Born. et Flah. IPPAS B-404			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота (ФАР= 0 мкмоль фотонов/(м ² ·с))			
1000 мкг	7,67±1,22	-	-	7,77±0,05
900 мкг	-	-	-	7,16±0,31
MIC, мкг/мл	1000	-	-	830 (R ² =1)
Свет (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))				
1000 мкг	8,67±4,9	-	-	8,80±0,15
900 мкг	-	-	-	8,4±0,11
800 мкг	-	-	-	7,87±2,99
500 мкг	-	-	-	7,70±0,59
200 мкг	-	-	-	6,92±0,05
100 мкг	-	-	-	6,40±0,48
MIC, мкг/мл	1000	-	-	72 (R ² =0,94)

Антибактериальные свойства имеют неполярные экстракты из биомассы клеток, выращенных в условиях режима культивирования 1 и 4. Причем эффективность экстракта (режим 4) также зависит от воздействия светового излучения – при воздействии света минимальная ингибирующая концентрация уменьшается в 11,5 раза. Экстракт (режим 1) проявляет минимальные ингибирующие свойства в отношении грамположительных бактерий только в очень высокой концентрации 1000 мкг/мл.

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что неполярные вещества культуральной жидкости *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS B-404 обладают значительными антибиотическими свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР=100±0,1 мкмоль фотонов/(м²·с)), так и в темноте. Условия культивирования штамма значительно влияют на эффективность воздействия экстракта в отношении грамположительных бактерий, наиболее перспективны режимы культивирования 1 и 2, позволяющие получить неполярные экстракты, имеющие величины минимальной ингибирующей концентрации 54–90 мкг/мл и 27–41 мкг/мл соответственно.

Литература

1. Gugger, M.F. Cyanotoxins and other bioactive compounds from the pasteur cultures of cyanobacteria (PCC) / M.F. Gugger, A. Boullié, T. Laurent // *Toxins*. – Vol. 15, № 6. – e388. DOI: 10.3390/toxins15060388.
2. Schirrmeister, B.E. Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils / B.E. Schirrmeister, M. Gugger, P.C. Donoghue // *Palaeontology*. – 2015. – Vol. 58. – P. 769–785. DOI:10.1111/pala.12178.
3. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing / P.M. Shih, D. Wu, A. Latifi et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2013. – Vol. 110. – P. 1053–1058. DOI: 10.1073/pnas.1217107110.
4. Cyanobacterial blooms / J. Huisman, G.A. Codd, H.W. Paerl et al. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16, № 8. – P. 471–483. DOI:10.1038/s41579-018-0040-1.
5. Natural product biosynthetic diversity and comparative genomics of the Cyanobacteria / E. Dittmann, M. Gugger, K. Sivonen, D.P. Fewer // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23, № 10. – P. 642–652. DOI: 10.1016/j.tim.2015.07.008.
6. Microalgae and cyanobacteria strains as producers of lipids with antibacterial and antibiofilm activity / V. Cepas, I. Gutiérrez-Del-Río, Y. López et al. // *Marine Drugs*. – 2021. – Vol. 19. – P. 675–694. DOI: 10.3390/md19120675.
7. Extracellular antibacterial substances in *Anabaena fertilissima* CCC597 kill bacteria by triggering oxidative radicals and destroying membrane integrity / T. Singh, P. Kumar, D. Suvendra, N. Bagchi // *Nova Hedwigia*. – 2020. – Vol. 110, № 3. – P. 247–267. DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2020/0573.
8. In vitro antibacterial evaluation of *Anabaena* sp. against several clinically significant microflora and HPTLC analysis of its active crude extracts / A. Chauhan, G. Chauhan, P. Gupta et al. // *Indian Journal of Pharmacology*. – Vol. 42, № 2. – P. 105–107. DOI: 10.4103/0253-7613.64490.
9. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches / J. Zhou, M. Wang, J.A. Saraiva, et al. // *Food Chemistry*. – 2022. – Vol. 384. – e132236. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.132236.
10. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – Москва: Мир, 1975. – 322 с.
11. Bonev, B. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method / B. Bonev, J. Hooper, J. Parisot // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 61, № 6. – С. 1295–1301. DOI: 10.1093/jac/dkn090.
12. Пурмаль, А.П.В. Простая кинетика сложных реакций: учебное пособие / А.П. Пурмаль Москва: МФТИ, 2011. – 109 с.
13. Ермакова, Н.В. Свободно-радикальное окисление жирных кислот молочного жира / Н.В. Ермакова // *Химическая кинетика и цепные реакции: теория и практика: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, к 125-летию со дня рождения академика Н.Н. Семёнова, Орел, 27 ноября 2020 года*. – Орел: Картуш, 2020. – С. 30–33.
14. Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites / D. Dvoretzky, S. Dvoretzky, M. Temnov et al. // *Chemical Engineering Transactions*. – 2019. – Vol. 74. – P. 1429–1434. DOI: 10.3303/CET1974239.