

УДК 663.02, 664, 579, 57.04, 547-32

**А.Р. МИКАЕЛЯН, Б.Г. БАБАЯН, Н.Л. АСАТРЯН, Т.М. СОГОМОНЯН,
С.К. КАРАДЖЯН, А.С. БАГДАСАРЯН, М.А. МЕЛКУМЯН,
А.Х. НАЗАРЕТЯН**

**ДЕЙСТВИЕ ВИННОЙ КИСЛОТЫ, ЕЕ НАТУРАЛЬНЫХ И
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА РОСТ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА
PSEUDOMONAS И ДРУГИХ ПОЧВЕННЫХ НЕПАТОГЕННЫХ И
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

В течение последних лет все большую актуальность приобретает проблема борьбы с формированием антибиотикорезистентных патогенных штаммов бактерий из почвенных непатогенных и условно-патогенных представителей, экологически наиболее безопасных и малотоксичных для человека соединений. В связи с этим в данной работе рассмотрено действие нового производного - бензилимида винной кислоты, на рост ряда модельных непатогенных и условно-патогенных микроорганизмов с различной антибиотикорезистентностью и выявлена его высокая антибактериальная активность.

Ключевые слова: *Pseudomonas*, антибиотикорезистентность, бензилиимид винной кислоты, антибактериальная активность.

Введение. В связи с постоянным увеличением числа новых синтетических соединений весьма остро встает проблема их экологической безопасности и биodeградируемости природными микроорганизмами. Одним из перспективных направлений в решении данной проблемы является синтез производных витальных соединений с улучшенными показателями [1]. Винная кислота (ВК) и ее соли известны широким применением в пищевой промышленности в качестве консервантов. Они маркированы в качестве относительно безопасных пищевых добавок E334-E337, E354 [2].

Актуальность разработки антимикробных препаратов нового поколения в связи с увеличением числа мультирезистентных патогенов (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Salmonella* и *Staphylococcus*) возрастает с каждым днем [3]. Их широкий спектр энзиматической активности определяет метаболизм и высокие показатели потенциала биodeградации ксенобиотиков [4]. Литературные данные свидетельствуют о значительной активности ВК, ее имидных и амидных производных и производных поликарбонновых кислот различной структуры по отношению к различным патогенам [5]. В связи с этим в данном исследовании было рассмотрено действие ВК, ее солей и нового синтетического

производного - бензилимида, на рост различных, модельных, условно-патогенных и непатогенных почвенных микроорганизмов.

Методическое обоснование и постановка задачи. Целью данного исследования является сравнительная оценка действия тартрата натрия, сегнетовой соли, ВК и бензилимида ВК, впервые полученного по технологии, разработанной в НПУА, на предмет антибактериальной активности по отношению к важнейшим модельным условно-патогенным и непатогенным грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам [6].

Объектом данного исследования служили почвенные непатогенные и условно -патогенные штаммы: *Staphylococcus aureus* 5203, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *E. coli* DH5 α /VOG16, *E. coli* DH5 α /pUC18, *E.coli* DH5 α , *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella enteritidis* из Национальной коллекции микроорганизмов ЦДМ ИПЦ “Армбиотехнологии” НАН РА. Для оценки антибактериального действия исследуемых веществ микроорганизмы были культивированы на средах мясопептонного агара (МПА) и мясопептонного бульона (МПБ) методом добавления в среду веществ в концентрации 0,5М и методом двуслойного агара при температуре 30...37°C в аэробных условиях [7]. В случае резистентных штаммов эксперимент был проведен как на питательной среде с антибиотиками, так и на полноценной питательной среде, не содержащей антибиотиков. В ходе исследования были использованы ампициллин (Amp) и канамицин (Kan) фирмы “Астория” в концентрации 50 мкг/мл.

Результаты. Исследования антибактериальной активности изучаемых соединений указанными двумя методами показали сходные эффекты (табл. 1-3, рис.). Как видно из рис. (б), на фоне подавления роста, начиная с третьих суток культивации, заметно наличие вторичного роста в ряде случаев действия солей винной кислоты, чего не наблюдается в случае бензилимида. Из данных табл. 1-3 видно, что бензилиимид ВК активно подавляет рост непатогенных *P. putida*, условно-патогенных *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis* и *St.aureus*, Amp-резистентного штамма *E. coli* DH5 α /pUC18 и абсолютно чувствительного к антибиотикам штаммов кишечной палочки. Однако он неактивен в отношении *K. Pneumonia* и Kan-резистентного, плазмидного штамма *E. coli* DH5 α /VOG16.ВК, не препятствует росту *P. putida*, являющегося модельным непатогенным организмом при изучении мультирезистентных патогенных штаммов *P. aeruginosa*.

Таблица 1

Действие винной кислоты и ее производных (“+” - рост микроорганизмов;
“- ” - подавление)

Соединение	<i>E. coli</i>			<i>K. pneumoniae</i>	<i>St. aureus</i> 5302	<i>S. enteritidis</i> 5244
	DH5a	VOG16	pUC18			
Бензилиимид	-	+	-	+	-	-
Na ₂ -тарترات	+	+	-	-	-	+
K/Na-тарترات	-	+	-	+	+	+
БК	+	+	+	+	+	+
Контроль (МПА)	+	+	+	+	+	+

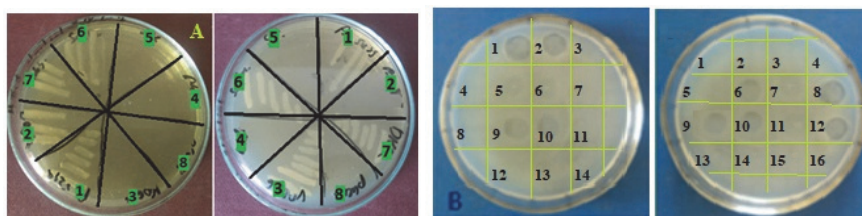


Рис. Анализ действия винной кислоты и ее производных на рост микробов методом посева на среду с добавлением 0,5М раствора исследуемых соединений (а) и методом двуслойного агара (б)

Таблица 2

Сравнение антибактериальной активности винной кислоты и ее производных против штаммов *P. putida* (“+” - рост микроорганизма, “-“ - подавление роста микроорганизма)

Штамм <i>P. putida</i>	Соединение (5 дней культивации, 37 °С, МПА, 0,05М)			
	Бензилиимид	БК	Na-тарترات	Тарترات –Na/K
<i>P. putida</i> 9222	-	+	+	-
<i>P. putida</i> 9235	-	+	+	-
<i>P. putida</i> 9254	-	+	-	+
<i>P. putida</i> 9249	-	+	-	+

Таблица 3

Сравнение воздействия винной кислоты и ее производных на чувствительные и резистентные штаммы *P. aeruginosa*. (R - резистентность, S - чувствительность, "+" – рост, "-" – отсутствие роста)

Штамм <i>P. aeruginosa</i>	R/S	Исследуемое соединение (5 дней культивации, 37°C, МПА, 0,05М)			
		бензилиимид ВК	тарترات– Na/K	тарترات - Na	ВК
<i>P. aeruginosa</i> 5249	R	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 9056	S	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> 9057	R	-	+	-	+
<i>P. aeruginosa</i> 9058	R	-	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> 9059	R	-	-	-	+

Заключение. Как видно из приведенных данных, мультирезистентный штамм *P. aeruginosa* 5249 устойчив к воздействию всех природных производных ВК, но чувствителен к бензилимиду. Это свидетельствует о наличии механизмов биодegradации тартратов, сопряженных с ферментами модификации антибиотиков, гены которых ответственны за резистентность, обнаружены в данном штамме и локализованы на плазмидах [8]. Различия в действии тартратов, вероятно, связаны с аллостерической регуляцией определенных ферментов, конформационно чувствительных к параметрам гидратных оболочек катионов. Возможно наличие механизмов противодействия проникновению данных соединений в клетку или механизмов активного вывода этих молекул, подобно системе эффлюкса, обеспечивающей резистентность ко многим антибиотикам [9]. Однако не все чувствительные штаммы подавляются исследуемыми веществами, что означает наличие метаболических путей, не связанных с механизмами резистентности к антибиотикам. Отсутствие вторичного роста при действии бензилимида, вероятно, связано с необратимым ингибированием, в отличие от обратимого ингибирования ферментов ВК и ее солями, с дозозависимым снижением эффекта. Данные свидетельствуют и об относительной биодegradуемости производных ВК почвенными микроорганизмами.

Таким образом, бензилиимид ВК может быть рекомендован для дальнейших исследований антимикробного воздействия в качестве потенциально активного средства борьбы с резистентными штаммами патогенных микроорганизмов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке МОН РА в рамках научного проекта № 15Ar_2e016.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Slizewska K., Barczynska R., Kapusniak J., Kapusniak J.** The Effect of Tartaric Acid-modified Enzyme-resistant Dextrin from Potato Starch on Growth and Metabolism of Intestinal Bacteria // *J Plant Pathol Microb.* – 2015. – V.6, is.5. – P. 2-6.
2. **Silva M.M., Lidon F.C.** An overview on applications and side effects of antioxidant food additives // *Emir. J. of Food and Agric.* – 2016. – 28(12). - P. 823-832.
3. Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art /**A.E. Maraolo, M. Cascella, S. Corcione, et al** // *Expert Rev. Anti Infect Ther.* – 2017. - 15(9). - P.861-871.
4. **Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R.** A Comprehensive Review of Aliphatic Hydrocarbon Biodegradation by Bacteria // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2015. – 3. - P.176.
5. **Oulkheir Kh. S., Ounine N., El Haloui E., Attarass B.** Antimicrobial Effect of Citric, Acetic, Lactic Acids and Sodium Nitrite against *Escherichia Coli* in Tryptic Soy Broth // *J. of Biology, Agric. and Healthcare.* – 2015. – V.5, N 3. - P.12.
6. **Dashchyan N.A., Asatryan N.L., Galstyan G.F., Mikaelyan A.R.** Obtaining Bioactive Additives of Cyclic Structure on the Basis of Optically Active Tartaric Acid // *Bulletin of NPUA: Coll. of scientific papers.* – 2014. - Pt. II. - P. 682-688.
7. **Прунтова О.В., Сахно О.Н.** Лабораторный практикум по общей микробиологии.- Владимир: Изд-во ВлГУ, 2005.- 76 с.
8. Plasmids isolated from *P. aeruginosa* soil strains carry the genes providing antibiotic resistance /**B. Babayan, A. Hovhannisyan, A. Sargsyan, et al** // *Materials of IV International Conference “Biotechnology. Science & Practice”.* – 2017. - P.48.
9. Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus *Rhodococcus* /**C.C.C.R.De Carvalho, S.S.Costa, P.Fernandes, et al** // *Pub. online 2014 Apr 4. Front Physiol.* – 2014. – 5. – P. 133.

Ա.Ռ. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Բ.Գ. ԲԱԲԱՅԱՆ, Ն.Լ. ԱՍԱՏՐՅԱՆ,
Տ.Մ. ՍՈՂՈՄՈՆՅԱՆ, Ս.Կ. ՂԱՌԱՋԱՆ, Ա.Ս. ԲԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ,
Մ.Ա. ՄԵԼԲՈՒՄՅԱՆ, Ա.Խ. ՆԱԶԱՐԵԹՅԱՆ

**ԳԻՆԵԹԹՎԻ ԵՎ ԴՐԱ ԲՆԱԿԱՆ ՈՒ ՄԻՆԹԵՏԻԿ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ
ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ PSEUDOMONAS ՑԵՂԻ ՀԱԿԱԲԻՈՏԻԿԱԿԱՅՈՒՆ
ՀՈՂԱՅԻՆ ՈՉ ԱԽՏԱԾԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼՆԵՐԻ, ՄԱՐԴՈՒ ԵՎ ԿԵՆԴԱՆԻՆԵՐԻ
ՀԱՄԱՐ ՄԻ ՇԱՐՔ ՊԱՅՄԱՆԱԿԱՆՈՐԵՆ ԱԽՏԱԾԻՆ, ՖԻՏՈԱԽՏԱԾԻՆ ԵՎ
ԷՆՏՈՄՈԱԽՏԱԾԻՆ ՄԱՆԲԵՆԵՐԻ ԱՃԻ ՎՐԱ**

Վերջին տարիներին կարևորագույն հիմնախնդիրներից է դարձել հակաբիոտիկակայուն, ախտածին մանրէների դեմ պայքարի էկոլոգիապես անվտանգ և ցածր թունավորությամբ միացությունների սինթեզը: Սույն աշխատանքում հետազոտվել է ՀԱՊՀ-ում առաջին անգամ սինթեզված գինեթթվի բենզիլիմիդի ազդեցությունը մի շարք հողային ոչ ախտածին և պայմանականորեն ախտածին, մոդելային, հակաբիոտիկակայունությամբ իրարից տարբերվող մանրէների աճի վրա: Գրանցվել է նշված միացության բարձր հակամանրէային ակտիվությունը:

Առանցքային բառեր. *Pseudomonas*, հակաբիոտիկակայունություն, գինեթթվի բենզիլիմիդ, հակամանրէային ակտիվություն:

**A.R. MIKAELYAN, B.G. BABAYAN, N.L. ASATRYAN,
T.M. SOGHOMONYAN, S.K. KARADJAN, A.S. BAGHDASARYAN, M.A.
MELKUMYAN, A.KH. NAZARETYAN**

**THE INFLUENCE OF TARTARIC ACID DERIVATIVES ON THE
GROWTH OF ANTIBIOTIC RESISTANT PSEUDOMONAS AND OTHER
NON-PATHOGENIC AND CONDITIONAL PATHOGENIC SOIL
MICROORGANISMS**

During the recent years, the elaboration of new ecologically safe antimicrobial agents against pathogenic microorganisms formed from non-pathogenic and conditionally pathogenic representatives has become urgent. Thus, in the present work, the influence of a new synthetic derivative of tartaric acid - benzylimide on some antibiotic resistant and sensitive model strains of bacteria is described. As a result of experiments, the high level of antimicrobial activity of benzylimide of tartaric acid is indicated.

Keywords: *Pseudomonas*, antibiotic resistance, benzyl imide of tartaric acid, antibacterial activity.