

УДК 66.091.2 + 632.92 + 632.95 + 551.435.84 + 577.181.7

**А.Р. МИКАЕЛЯН, Б.Г. БАБАЯН, Н.Л. АСАТРЯН, М.А. МЕЛКУМЯН,
А.М. ГРИГОРЯН, Т.М. СОГОМОНЯН, С.А. БАГДАСАРЯН,
М.А. КИНОСЯН, Т.С. ДАВИДЯН, П.Е. ТАДЕВОСЯН, Г.Г. МЕЛЯН,
С.М. ШАГИНЯН**

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ И БИОДЕГРАДАЦИОННОГО
ПОТЕНЦИАЛА НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ВИННОЙ КИСЛОТЫ НА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ ИЗ ИСКОПАЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ПЕЩЕРЫ
АСНИ**

Изучен потенциал биодegradации производных винной кислоты бациллами, впервые выделенными из окаменелости пещерной грязи пещеры и акведука Асни. Обнаружены четыре культуры термофильных спороносных *Bacillus*, деградирующих новые производные винной кислоты. Исследование представляет экологическую и археологическую значимость.

Ключевые слова: микроорганизмы пещер, биодegradация, синтетические производные винной кислоты, мультирезистентность.

Введение. Винная кислота (ВК) наиболее распространена среди альдарических кислот растений. Производные ВК используются в качестве безопасных пищевых добавок [1]. *Stenotrophomonas* и *Pseudomonas* сходны по метаболизму и повсеместной распространенности, включают патогенные и непатогенные виды, обитающие на влажных поверхностях природного и антропогенного происхождения, включая карстовые пещеры и подземные конструкции [2]. *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* часто выступают редуцентами в составе цепей питания в силу значительного потенциала к биодegradации ксенобиотиков, высокой адаптивности и способности вступать в кворумы, распространяя резистентность путем горизонтального переноса генов [3]. В силу описанных свойств они являются удобными моделями для изучения адаптационных механизмов бактерий. В данной работе рассмотрен потенциал биодegradации двух новых классов синтетических производных ВК почвенными *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и бациллами, выделенными из окаменелости пещерной грязи и почвы вблизи пещеры Асни [4].

Материалы и методы. Новые производные ВК были синтезированы согласно методике очистки ВК и ее дериватизации, разработанной в НПУА [5]. Изученные штаммы почвенных бактерий (использованные в качестве контрольных, модельных штаммов при изучении пещерных микроорганизмов)

видов: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *P. geniculate*, *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. taetrolens*, а также *E. coli* были взяты из Национальной коллекции культур ЦДМ, НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА. Штаммы бактерий, выделенные из окаменелости пещерной грязи и почвы вблизи пещеры и акведука Асни, были изучены при поддержке Спелеологического центра Армении и ЦДМ, НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА [6]. Культивация почвенных бактерий проводилась с использованием жидких и твердых полноценных (МПА и МПБ) и минеральных сред. Биодegradационный потенциал был изучен с применением солевой среды М9 с добавлением тестируемых соединений в качестве источника углерода. Анализ передаваемости резистентности плазмидами был проведен методом трансформации согласно стандартным протоколам получения компетентных клеток при помощи CaCl_2 . В качестве реципиентов были использованы штаммы различных видов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *E. coli* [7,8].

Результаты. Согласно полученным данным, штаммы почвенных *P. taetrolens* 9248, *P. taetrolens* 9244, *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 90615, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 9330, *S. maltophilia* 9285, *P. aeruginosa* 5249b, *Pseudomonas* sp. 9327 продемонстрировали способность роста на среде, содержащей 0,5М бензил моноамино соли ВК (BAS), циклогексил моноамино соли ВК (CAS), циклогексилимида ВК (CI), бензилимида ВК (BI), в качестве источника углерода. Штамм *S. maltophilia* 9289 деградирует CAS в концентрациях 0,005-0,1М. В случае тех же концентраций BAS к биодegradации способны штаммы: *S. maltophilia* 9302, 9302,9308, *P. fluorescens* 9087; в концентрации 0,1М, *P. fluorescens*9070, *S. maltophilia* 9308 биодegradируют CAS, а *P. chlororaphis*, subsp. *chlororaphis* 9175 деградируют BAS (рис.1).



Рис. 1. Биодegradация синтетических производных ВК: 1 – *S. maltophilia* 9285; 2 - *P. taetrolens* 9248; 3 - *P. taetrolens* 9248; 4 - *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 9061; 5 - *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 9330; 6 - *Pseudomonas* sp. 9327; 7 - *P. putida* var. *melanogenes* 9253; 8 - *S. maltophilia* 9280

Изучение около 60 штаммов 7 видов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* показало возможность биодegradации синтетических производных ВК для большинства непатогенных представителей. Эксперименты по трансформа-

ции штаммов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *E. coli* показали отсутствие передаваемости данного свойства плазмидами, передающими биодеградационные свойства и антибиотик-резистентность у данных бактерий. Часть спороносных и неспороносных штаммов, изолированных из ископаемых образцов из пещеры Асни, является устойчивой к синтетическим производным винной кислоты и способна к их биодеградации, в то время как часть представителей чувствительна к тем же соединениям (таблица, рис. 2) [9]. Термофильные штаммы менее резистентны к данным веществам, в то время как рост психрофильных *Bacillus* не подавляется.

Таблица

Рост пещерных микроорганизмов на производных ВК

Психрофильные штаммы (4-22°C)	ВК	Na ₂ TA	BI	CI	BAS	CAS	EDTA	BzCl	C ⁻	C ⁺
культура N1	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	-	+
культура N2	+	+	+	+/-	+	+/-	-	+	-	+
культура N3	+	+	+	+/-	+	-	-	-	-	+
культура N4	-	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+
Термофильные штаммы (56°C)	TA	Na ₂ TA	BI	CI	BAS	CAS	EDTA	BzCl	C	C ⁺
культура N5	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+
культура N6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
культура N7	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	+
культура N8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание: «+» – рост, «-» отсутствие роста, «+/-» – низкая интенсивность роста/отдельные колонии после 5 дней культивации; C⁺ – позитивный контроль на полноценной среде; C⁻ – негативный контроль на минеральной среде М9 без источника углерода; тестируемые вещества (1%): Na₂TA – тартрат Na, BI – бензилид ВК, CI – циклогексилид ВК, BAS – бензил моноамино соль ВК, CAS – циклогексил моноамино соль ВК, EDTA – Трилон Б, BzCl – бензил хлорид.

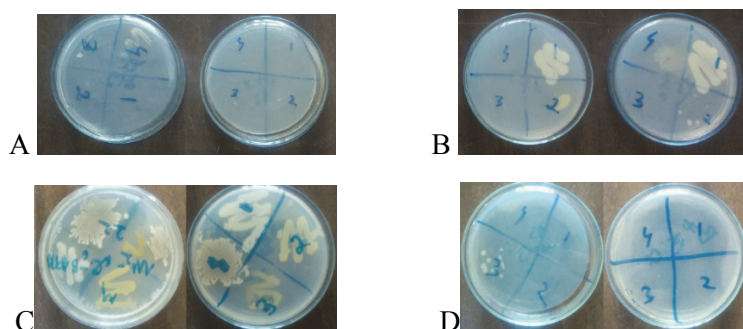


Рис. 2. Действие синтетических производных ВК на рост пещерных спороносных термофильных *Bacillus*: 56°C (А) и 22°C (В). Биодеградация производных ВК пещерными спороносными и неспороносными психрофильными штаммами *Bacillus*: (22°C) (С) и 56°C (D)

Как видно из приведенных данных, некоторые штаммы способны к деградации хелатирующего агента - Трилона Б и бензилхлорида, токсичного и мутагенного для большинства организмов [9, 10].

Заключение. Потенциал деградации 4 бензил и циклогексил производных ВК варьирует у различных видов *Pseudomonas* с наивысшими показателями у непатогенных *P. chlororaphis*. Часть штаммов *S. maltophilia* способна к утилизации данных соединений в качестве источника углерода. В случае имидов и солей циклогексил-производные деградируют менее интенсивно. Изучение культур микроорганизмов, выделенных из окаменелости пещерной грязи пещеры Асни, показало, что термофильные спороносные штаммы демонстрируют большую чувствительность к производным ВК, как природным, так и синтетическим, в то время как неспороносные и спороносные психрофильные штаммы продемонстрировали устойчивость к бензилмоноамино соли и бензилимиду ВК и биodeградационный потенциал. Резистентность к циклогексил моноамино соли ВК ниже, чем в случае аналогичного бензил-производного. Деградируемость циклогексил-замещенных производных также ниже, чем в случае бензил-производных ВК. Синтетически производные ВК могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения их свойств как потенциально экологически безопасных соединений, подавляющих рост мультирезистентных микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Influence of Tartaric Acid Derivatives on The Growth of Antibiotic Resistant /**A.R. Mikaelyan, B.G. Babayan, A N.L. Asatryan, T.M. Soghomonyan, et al** // *Pseudomonas* And Other Non-Pathogenic And Conditional Pathogenic Soil Microorganisms: NPUA Bulletin, Collection of Scientific Papers. – 2019.- V.2. - P. 696 -701.
2. **Sands D.C., Schroth M.N., Hildebrand D.C.** Taxonomy of Phytopathogenic // *Pseudomonads*: J Bacteriol. – 1970. – V.101(1). – P. 9–23.
3. **Klemm E.J., Wong V.K., Dougan G.** Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing // PNAS – 2018. – V. 115(51). – P. 12872-12877.
4. **Shahinyan S.M.** The results of The International Expedition “Ararat Depression 2019 season”. – 2019. -P. 11-12.
5. **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 sci. papers. – 2014. – P. II - P. 682.
6. **Babayan B.G., Mikaelyan A.R., Shahinyan S.M., Bagdasaryan S.A.** Tartaric Acid New Derivatives Effect Against The Soil *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* As A Model For Research of Cave Infection Bacteria Antibiotic Resistance Combating // The book of Abstracts: Int. Conference: "Caves As Natural & Cultural Monuments". – 2019. - P. 22 -23.

7. **Karimi B., Habibi M., Esvand M.** Biodegradation of naphthalene using *P. aeruginosa* by up flow anoxic–aerobic continuous flow combined bioreactor // J Environ Health Sci Eng. – 2015. – P. 13-26.
8. **Birger M.O.** Handbook of microbiological and virological methods of research. - M., 1982. - 354 P.
9. **European Chemicals Bureau.** Existing Substances, EU Risk Assessment Report, EDETIC ACID (EDTA) //European Communities. – 2004. - P. 12-76.
10. **Nirogi R., Goyal V.K., Jana S., Pandey S.K., Gothi A.** Mutagenicity and clastogenicity evaluation of metaphenoxy benzyl chloride by ames and micronucleus assays, Drug Chem Toxicol. – 2015. – V. 38(2). - P. 235-240.

Ա.Ռ. ՄԻՔԱԵԼՅԱՆ, Բ.Գ. ԲԱԲԱՅԱՆ, Ն.Լ. ԱՍԱՏՐՅԱՆ, Մ.Ա. ՄԵԼԿՈՒՄՅԱՆ, Ա.Մ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Տ.Մ. ՍՈԴՈՄՈՆՅԱՆ, Ս.Ա. ԲԱԳԴԱՍԱՐՅԱՆ, Մ.Հ. ԿԻՆՈՍՅԱՆ, Տ.Ս. ԴԱՎԻԴՅԱՆ, Պ.Ե. ԹԱԴԵՎՈՍՅԱՆ, Գ.Հ. ՄԵԼՅԱՆ, Ս.Մ. ՇԱՀԻՆՅԱՆ

ԳԻՆԵԹԹՎԻ ՆՈՐ ՍԻՆԹԵՏԻԿ ՀԱԿԱՄԱՆՐԷԱՅԻՆ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ ԱՉԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԿԵՆՍԱՔԱՅՔԱՅՄԱՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՍՆԻ ՔԱՐԱՆՁԱՎԻ ԲՐԱԾՈՆԵՐԻ, ՄԻ ՇԱՐՔ ԲԱԶՄԱԿԱՅՈՒՆ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ՎՐԱ

Հետազոտվել է գինեթթվի ածանցյալների կենսաքայքայման հնարավորությունը Ասնի քարանձավի և ջրատարի քարանձավային ցեխի բրածոներից առաջին անգամ մեկուսացված բացիլների կողմից: Հայտնաբերվել են թերմոֆիլ *Bacillus*-ի 4 կոկտուրա, որոնք ունակ են գինեթթվի նոր ածանցյալները քայքայելու: Ուսումնասիրությունն ունի էկոլոգիական և հնէաբանական նշանակություն:

Առանցքային բառեր. քարանձավային միկրոօրգանիզմներ, կենսաքայքայում, գինեթթվի սինթետիկ ածանցյալներ, բազմակայունություն:

A.R. MIKAELIAN, B.G. BABAYAN, N.L. ASATRYAN, M.A. MELKUMYAN, A.M. GRIGORYAN, T. M. SOGHOMONYAN, S.A. BAGDASARYAN, M.A. KINOSYAN, T.S. DAVIDYAN, P.E. TADEVOSYAN, G.H. MELYAN, S.M. SHAHINYAN

TARTARIC ACID NEW SYNTHETIC ANTIBACTERIAL DERIVATIVE BIODEGRADATION POTENTIAL RESEARCH ON MULTIDRUG-RESISTANT MICROORGANISMS OF ASNI CAVE ANCIENT FOSSILES

In the current paper, the potential of tartaric acid derivative biodegradation by newly discovered microorganisms, isolated from fossil cave mud of Asni Cave and Aqueduct, was discussed. Four cultures of thermophilic spore-forming *Bacillus*, which are able to biodegradation the tartaric acid derivatives were discovered. These research have ecological and archeological significance.

Keywords: cave microorganisms, biodegradation, tartaric acid derivatives, multi-drug resistance.