



УДК:579.8.06

Бехруз ТОЖИЕВ,

Базовый докторант, Институт Микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: bekhruz.tadzhiev@microbio.uz, ORCID: 0000-0002-4861-8905

Дилором РУЗИЕВА,

Канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: druzieva@mail.ru, ORCID: 0000-0002-3333-0837

Тошхон ГУЛЯМОВА,

Профессор, д-р биол. наук, зав. лабораторией Института микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

E-mail: tgulyatova@gmail.com, ORCID: 0000-0002-9226-864X

Согласно обзору проф., д.б.н К. Нормуродовой Национального университета Узбекистана им. Мирзо Улугбека

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА РАБОТЫ ЭКСТРАКТА ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИТА ШТАММА *ALTERNARIA* SP. GB8S

Аннотация

В настоящем исследовании было изучено способность подавлять образование биопленки условно-патогенных штаммов бактерий *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* в котором процент ингибирования биопленки составлял от 75 до 78%, при концентрации вещества в 62,5 мкг/мл. Также используя ту же минимальную концентрацию вещества, была изучена динамика антибиопленочной активности экстракта в течении 6-72 часов с целью определения продолжительности и устойчивости его ингибирующего действия. Проведя такого рода исследования, стало понятно, что экстракт выделенный из изолята Gb8S, сохраняет свою активность в до 24 часов после применения экстракта, с процентом ингибирования от 65 до 71%, начиная с 36-го часа экспозиции отмечалось постепенное снижение активности экстракта до менее 60%.

Ключевые слова: Антибиопленочная активность, МИК, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

ALTERNARIA SP. GB8S NING IKKILAMCHI METABOLIT EKSTRAKTINING VAQT DINAMIKASINI O'LGHASH

Аннотация

Ushbu tadqiqotda ekstraktning *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* va *Candida albicans* shtamlari tomonidan biofilm hosil bo'lishini inhibe qilish qobiliyati o'rganildi, bu 62,5 mkg/ml konsentratsiyada 75 dan 78% gacha biofilm inhibitsiyon darajasini berdi. Xuddi shu minimal konsentratsiyadan foydalanib, ekstraktning antibioplilm faolligi uning inhibitiv ta'sirining davomiyligi va barqarorligini aniqlash uchun 6-72 soat davomida o'rganildi. Ushbu tadqiqotlar shuni ko'rsatdiki, Gb8S izolyatidan ajratilgan ekstrakt qo'llanilgandan keyin 24 soatgacha o'z faolligini saqlab qoldi, inhibitsiyon darajasi 65 dan 71% gacha. 36 soatlik ta'sirdan so'ng, faollikning asta-sekin 60% dan pastga pasayishi kuzatildi.

Kalit so'zlar: Antibiofilm faolligi, MIC, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*.

TIME COURSE OF THE SECONDARY METABOLITE EXTRACT OF *ALTERNARIA* SP. GB8S

Annotation

This study examined the ability of the extract to inhibit biofilm formation by opportunistic bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*, with biofilm inhibition rates ranging from 75 to 78% at a concentration of 62.5 µg/ml. Using the same minimum concentration, the extract's antibiofilm activity was also studied over 6-72 hours to determine the duration and sustainability of its inhibitory effect. These studies revealed that the extract isolated from isolate Gb8S retains its activity for up to 24 hours after application, with inhibition rates ranging from 65 to 71%. Beginning after 36 hours of exposure, a gradual decrease in activity to less than 60% was observed.

Keywords: Antibiofilm activity, MIC, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*,

Введение. Антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов является одной из наиболее серьезных угроз современной медицине. Особую клиническую значимость имеют биоплёнки *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, характеризующиеся повышенной устойчивостью к антимикробным препаратам и защитным механизмам организма [1].

Формирование биоплёнки – динамический процесс, включающий стадии первичной адгезии, образования микроколоний, созревания и дисперсии. Поскольку биомасса и метаболическая активность биоплёнок изменяются во времени, оценка действия исследуемых соединений только в одной временной точке может не отражать их реальную эффективность. В связи с этим временно-разрешённый анализ с использованием окрашивания кристаллическим фиолетовым и измерения оптической плотности позволяет определить стадии, на которых антибиоплёночное действие проявляется наиболее выражено [2–4].

Эндоефитные грибы лекарственных растений – перспективный источник таких соединений благодаря структурно разбросанным вторичным метаболитом [5]. Метаболиты *Alternaria* sp, способны нарушать *quorum sensing* *P. aeruginosa*, подавлять формирование и разрушение биоплёнки *S. aureus* [1, 5]

Ginkgo biloba L. является ценным лекарственным растением и источником разнообразных эндофитных микроорганизмов, многие из которых проявляют антимикробную активность и продуцируют биологически активные соединения. Однако временная динамика антибиоплёночного действия вторичных метаболитов *Alternaria* sp, выделенной из *G. biloba*, остаётся практически не изученной [6]. Настоящая работа посвящена оценке динамики ингибирования формирования биопленки экстрактом вторичных метаболитов штамма *Alternaria* sp. Gb8S, выделенного из *G. biloba* L., в отношении клинически значимых микроорганизмов - *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* - на серии временных точек с применением метода кристаллического фиолетового (OD_{590}).

Материалы и методы. *Получение экстракта вторичных метаболитов.* Для определения биологических активностей экстракцию метаболитов из биомассы эндофитных трибов проводили по данным Ланг [7], с модификациями Хазалина и др. [8]. Для этого 5 г замороженной биомассы растирали в ступке со стеклянным песком и 50 мл этилового эфира уксусной кислоты, переносили в коническую колбу и оставляли на сутки на качалке при комнатной температуре для перемешивания. Затем смесь отфильтровывали через бумажный фильтр (ватман бумага №1) и добавляли Na_2SO_4 из расчета 40 мг/мл для удаления водного слоя. Далее смесь упаривали досуха на роторном испарителе и добавляли 1 мл маточный раствор и хранили при температуре +40 °C [9].

Определение минимальной ингибирующей (МИК). Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) экстракта определяли методом серийных двукратных разведений в жидкой питательной среде в соответствии с рекомендациями Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) с незначительными модификациями. Для этого готовили последовательные двукратные разведения экстракта в бульоне Мюллера-Хинтона в диапазоне концентраций от 500 до 0,98 мг/мл. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 100 мкл соответствующего разведения экстракта и 100 мкл бактериальной суспензии, стандартизированной до 0,5 единиц по шкале МакФарланда и разведённой до конечной концентрации около 5×10^5 КОЕ/мл. Планшеты инкубировали при температуре 37°C в течение 18-24 часов. За значение МИК принимали наименьшую концентрацию экстракта, при которой отсутствовал видимый рост микроорганизмов [10].

Определение временной динамики ингибирования формирования биоплёнки. Временную динамику ингибирования формирования биоплёнки определяли методом окрашивания кристаллическим фиолетовым в 96-луночных полистирольных планшетах. В качестве тест-культур использовали *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. В лунки планшета вносили по 100 мкл стандартизированной микробной суспензии и 100 мкл раствора экстракта в концентрации, соответствующей ранее установленной минимальной ингибирующей концентрации. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 6, 12, 24, 36, 48 и 72 часов [12].

По окончании каждой временной точки не прикрепившиеся клетки удаляли, лунки промывали PBS, биоплёнку фиксировали метанолом, окрашивали 0,1%-ным раствором кристаллического фиолетового и после элюции красителя 33%-ной уксусной кислотой измеряли оптическую плотность при 590 нм. Процент ингибирования рассчитывали относительно контроля по стандартной формуле [13].

Статистическая обработка данных. Все эксперименты были выполнены независимо в трех повторностях, и результаты представлены в виде среднего $\pm$ стандартного отклонения (SD). Обработка данных и графическое представление проводились с использованием Microsoft Excel 2021 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) [13].

Результаты. В ранее проведенном исследовании по определению и идентификации микрофлоры реликтового растения *G. biloba* L, были выделены 30 изолятов. Каждый выделенный изолят был исследован на наличие антибактериальной и антибиопленочной активности. В ранее проведенных исследованиях по отбору наиболее активных изолятов, концентрация вещества была 150мкг/мл, среди которых 3 изолята показали относительно хорошие результаты по сравнению с другими вторичными метаболитами, ранее проведенными исследованиями. Также при исследовании выделенных изолятов Gb1L, Gb7S и Gb8S показавшие относительно хорошие были идентифицированы как *Alternaria*, *Penicillium* и *Clostridium* [16] морфологическим признакам.

В последующих этапах изучения антибиопленочной активности вторичных метаболитов эндофитных грибов, уже ранее отобранных трех наиболее активных изолятов, были повторно проверены на антибиопленочный эффект ближе к минимальным концентрациям. Данное исследование было сделано после того, как был определен МИК, концентрация которого составила 62,5мкг/мл. Данный изолят проявил хорошую антибиопленочную активность в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, что обусловило его отбор в качестве объекта для углублённого изучения способности подавлять формирование бактериальных биоплёнок (рис. 1).

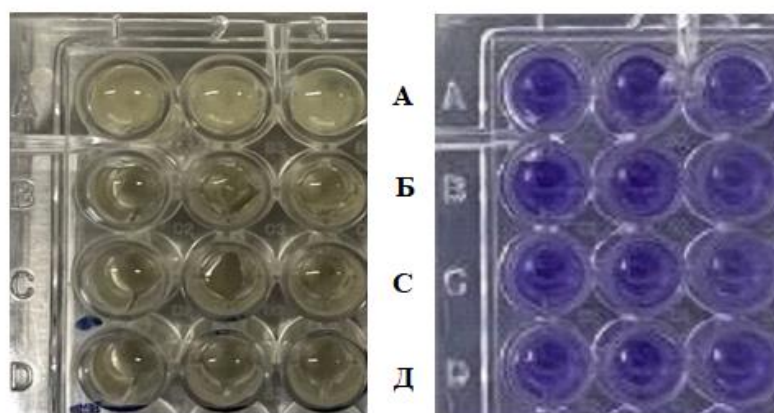


Рисунок 1. Фотография 96-луночного планшета до окрашивания кристаллическим фиолетовым (ряд А. - отрицательный контроль; ряд В. - экстракт GB8S (64,5 мг/мл); ряд С. - гентамицин (65 мг/мл); ряд D. - цефтриаксон (65 мг/мл), положительный контроль)

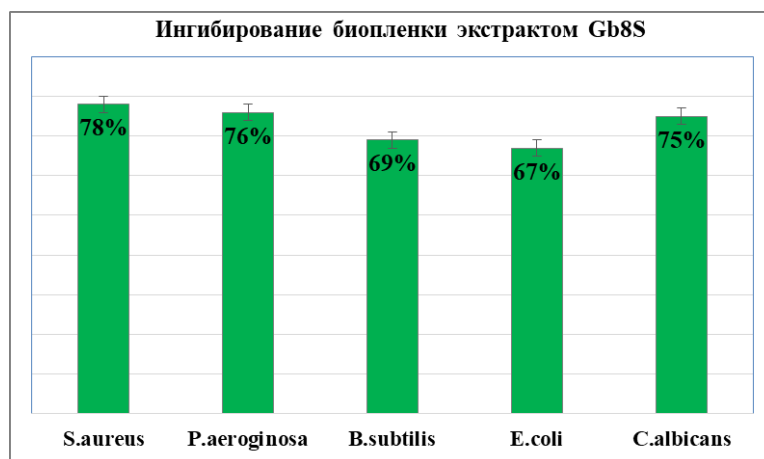


Рисунок 2. Ингибирование биопленки экстрактом Gb8S

96-луночный планшет представлен до окрашивания кристаллическим фиолетовым, где ряд А служил отрицательным контролем (среда с инокулятом без обработки) и характеризовался заметным помутнением, тогда как лунки рядов В (экстракт GB8S, 62,4 мкг/мл), С (гентамицин, 60 мкг/мл) и D (цефтриаксон, 62 мкг/мл, положительный контроль) визуально выглядели прозрачными или слабомуточными. Отсутствие окраски на данном этапе позволяет зафиксировать исходное состояние лунок и служит отправной точкой для последующего сравнительного анализа степени биоплёнкообразования. В ходе исследования было определено, что, изолят GB8S имеет хороший антибиопленочную активность достигла 78% ингибирующей активности, в то время как самый низкий процент составил 67%.

Поэтому следующим этапом исследования стала оценка временной динамики ингибирования формирования биоплёнки с целью определения устойчивости антибиопленочного эффекта на различных стадиях её развития (рис.3).

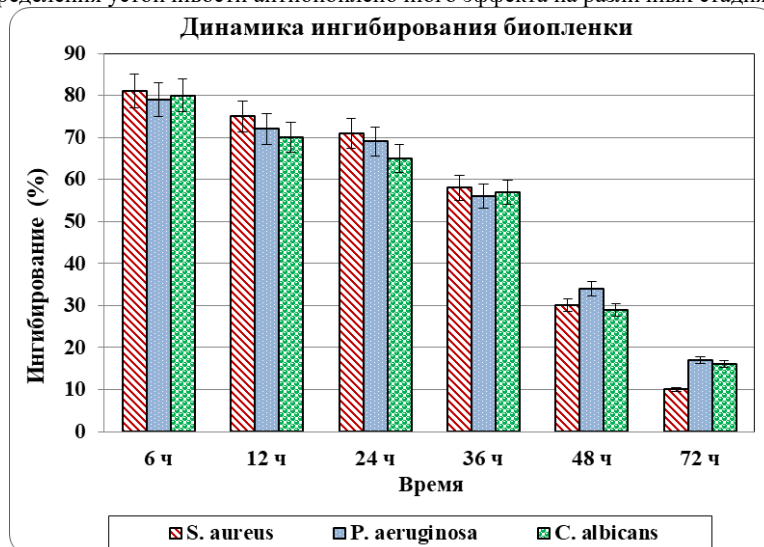


Рисунок 3. Динамика ингибирования формирования биоплёнки экстрактом вторичных метаболитов GB8S в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

Динамика ингибирования формирования биоплёнки экстрактом вторичных метаболитов GB8S в течение 72 часов было проведено с целью определения продолжительности сохранения антибиопленочной активности экстракта. Во всех исследованных микроорганизмах максимальная антибиопленочная активность наблюдалась на ранних этапах формирования биоплёнки, как обычно в первые 24ч инкубации бактериальной суспензии. Через 6 часов инкубации степень ингибирования составила 81% для *Staphylococcus aureus*, 79% для *Pseudomonas aeruginosa* и 80% для *Candida albicans*.

В последующие временные интервалы эффективность экстракта постепенно снижалась. Через 24 часа ингибирование формирования биоплёнки оставалось высоким и составляло 71%, 69% и 65% соответственно. Однако после 36 часов наблюдалось выраженное уменьшение антибиопленочной активности, а после 48 часов снижение стало более интенсивным. Минимальные значения ингибирования были зарегистрированы через 72 часа инкубации и составили 1% для *S. aureus*, 17% для *P. aeruginosa* и 16% для *C. albicans*.

Выводы. Вторичные метаболиты эндофитного гриба *Alternaria alternata* GB8S, выделенного из *Ginkgo biloba* L., проявили выраженную антимикробную и антибиопленочную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Максимальное ингибирование биоплёнкообразования, составлявшее 65–80%, наблюдалось в первые 6–24 часа и сохранялось до 36 часов, после чего эффективность экстракта снижалась. Это указывает на преимущественное воздействие метаболитов GB8S на первичную адгезию клеток и формирование микроколоний. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности штамма GB8S как источника природных антибиопленочных соединений.

Обсуждение. Экстракт вторичных метаболитов *Alternaria sp.* GB8S эффективно ингибировал формирование биоплёнок *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, причём наибольшая активность наблюдалась в первые 24 часа инкубации.

Степень ингибирования достигала 81% для *S. aureus*, 79% для *P. aeruginosa* и 80% для *C. albicans*, что превышает показатели 57–72%, ранее установленные для этилацетатных экстрактов грибов рода *Alternaria* [5]. После 36 часов активность экстракта снижалась, что может быть связано с созреванием биоплёнки, увеличением её биомассы и усложнением структуры [2]. Следовательно, экстракт GB8S наиболее эффективен на ранних этапах биоплёнокообразования, поскольку данные о временной динамике антибиоплёночного действия метаболитов *A. alternata*, выделенной из *Ginkgo biloba*, практически отсутствуют [6], полученные результаты расширяют представления о кинетике действия эндофитных грибных метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rashmi M.M. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of *Alternaria alternata*, a foliar endophyte of *Carica papaya*, evidenced by QS assays and *in-silico* analysis // *Fungal Biology*, V 122, Issue 10, P. 998-1012. 2018. doi: 10.1016.
2. Andersen J.B., Rybtke M., Tolker-Nielsen T. The dynamics of biofilm development and dispersal should be taken into account when quantifying biofilm via the crystal violet microtiter plate assay // *Pub. Med, Biofilm*, V. 8, P. 100207. 2024. doi: 10.1016.
3. Zago C. E. Dynamics of Biofilm Formation and the Interaction between *Candida albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA) and - Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *PLoS One*. 2015. V.10(4):e0123206. doi: 10.1371/journal.pone.0123206.
4. Ziemytę M., Carda-Díez M., Rodríguez-Díaz J. C., Ventero M. P., Mira A. Ferrer M. D. Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth dynamics and persister cells' eradication // *Emerg Microbes Infect*, V. 10, Issue 1, P. 2062-2075, doi: 10.1080/22221751. 2021. 1994355.
5. Caruso D.J., Palombo E.A., Moulton S.E., Duggan P.J., Zaferanloo B. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Endophytic *Alternaria sp.* Isolated from *Eremophila longifolia* // *Antibiotics (Basel)*, V. 12, Issue. 9. P. 1459, 2023, doi: 10.3390/12091459.
6. Yuan Z., Tian Y., He F., Zhou H. Endophytes from *Ginkgo biloba* and their secondary metabolites, *Chin Med*, V. 14. P. 51, 2019, doi: 10.1186/s13020-019-0271-8.
7. Lang G., Blunt J.W., Cummings N.J., Cole A.L., Munro H.G. Hirsutide, a cyclic tetrapeptide from a spider-derived entomopathogenic fungus, *Hirsutella sp.* // *J. Nat Prod*. V. 68, Issue 8, P. 1303-1305, 2005, doi: 10.1021/0501536.
8. Hazalin N.A., Ramasamy K., Lim S.M., Wahab I.A., Cole A.L., Abdul Majeed A.B. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia // *BMC Complement Altern Med*, V. 9, P. 46, 2009, doi: 10.1186/1472-6882-9-46.
9. Абдульмянова Л. И., Рузиева Д. М., Депсинов Р. И., Гулямова Т. Г. // Влияние экстракта *Aloe vera* на антибактериальные свойства ассоциированных эндофитных грибов // *Universum: химия и биология*, Т. 1, Вып. 1 (115), С. 16–24, 2024.
10. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances // *Nat Protoc*, V. 3, Issue. 2, P. 163-175. 2008, doi: 10.1038.
11. 12. Negri M., Gonçalves V., Silva S., Henriques M., Azeredo J., Oliveira R. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells // *J. Biomed Sci*, V. 67, Issue. 3, P. 120-125, 2010, doi: 10.1080/09674845.
12. Andersen J.B., Rybtke M., Tolker-Nielsen T. The dynamics of biofilm development and dispersal should be taken into account when quantifying biofilm via the crystal violet microtiter plate assay // *Pub. Med, Biofilm*, V. 8, P. 100207, 2024, doi: 10.1016.