

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Д и п л о м н а р о б о т а

на здобуття ступеня вищої освіти магістр

на тему: **«Чутливість планктонних та біоплівкових культур
Staphylococcus aureus до 2-гепитил-3-гідроксі-4 хінолону та його похідних»**

«Sensitivity of planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus aureus* to
2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone and its derivatives»

Виконала: студентка денної форми
навчання

Спеціальність 091 Біологія
ОП Мікробіологія і вірусологія
Браїлова Анна Вікторівна

Науковий керівник:
доктор біологічних наук, професор
Філіпова Тетяна Олегівна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Паузер Олена Борисівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ __ від _____ 2020 р.

Завідувач кафедри
_____ Філіпова Т.О.
(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № 1
протокол № __ від _____ 2020 р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)
Голова ЕК
_____ Філіпова Т.О.
(підпис)

Одеса 2020

АННОТАЦІЯ

Дипломну роботу виконано на базі Проблемної науково-дослідницької лабораторії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Вивчення впливу синтетичних аналогів 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону показало, що різні концентрації досліджуваної сполуки діють по різному на ріст та формування біоплівки тест-штамів, персистуючі клітини та сформовану біопліку *Staphylococcus aureus*, викликаючи як стимуляцію або пригнічення, так і взагалі не індукуючи жодних змін. Але при певних концентраціях у конкретних штамів спостерігався чітко виражений стимулюючий чи/або пригнічуючий ефект на ріст та інтенсивність формування біоплівки мікроорганізмами.

Роботу викладено на 47 сторінках, вона містить 4 таблиці, та 6 рисунків. Наведено посилання на 63 джерел літератури (7 кирилицею та 56 латиницею).

Ключові слова: *Staphylococcus aureus*, біоплівка, планктонна культура, PQS, синтетичні аналоги PQS,

SUMMARY

The thesis was carried out on the basis of the Problematic Research Laboratory of the Odessa National University named after I.I. Mechnikov.

The study of the effect of synthetic analogues of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone showed that different concentrations of the test compound act differently on the growth and formation of the test strain biofilm, the persistent cells and the formed *Staphylococcus aureus* biofilm, either stimulating or stimulating or stimulating without causing any changes at all. However, at certain concentrations in specific strains, there was a clearly expressed stimulating or / suppressing effect on the growth and intensity of the formation of biofilm by a microorganism.

The work is presented on 47 pages, it contains 4 table, and 6 figures. Reference is made to 63sources of literature (7 Cyrillic and56 Latin).

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilm, plankton culture, PQS, PQS synthetic analogs

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

KУО – колонієутворюючі одиниці

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

GC – метод газової хроматографії

MRSA – метицилін-резистентний золотистий стафілокок

PIA – полісахаридний міжклітинний адгезин

SCV – варіанти малих колоній

TSA – триптично соєвий агар

QS – почуття кворуму

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Характеристика роду <i>Staphylococcus</i>	7
1.2. Біоплівкоутворення <i>Staphylococcus aureus</i>	11
1.3. Антимікробна активність синтетичних похідних PQS	13
1.4. Чутливість <i>S. aureus</i> до антимікробних сполук 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону та його похідних.....	18
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	23
2.1. Штами і сполуки, використані у роботі.....	23
2.2. Визначення впливу PQS та його синтетичних похідних на ріст планктонної культури та формування біоплівки тест-штамами мікроорганізмів	24
2.3. Статистична обробка результатів дослідження.....	26
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	27
3.1. Дослідження впливу PQS та його синтетичних похідних на планктонну культуру та формування біоплівки <i>S. aureus</i>	27
3.2. Вплив синтетичних аналогів сигнального хінолону на зрілі біоплівки штамів <i>S. aureus</i>	32
УЗАГАЛЬНЕННЯ	37
ВИСНОВКИ	40
СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	41

ВСТУП

Бактерії *Pseudomonas aeruginosa* завдяки сигнальним молекулам, які формують *почуття кворуму* (QS), можуть пристосовуватися до особливостей середовища, регулювати фактори вірулентності і найголовніше – взаємодіяти один з одним перебуваючи у біоплівці.

Pseudomonas aeruginosa може згубно впливати на біоплівки різних грампозитивних і грамнегативних бактерій порушуючи їх міжклітинний зв'язок і, тим самим, створювати для себе сприятливі умови, стаючи домінантною в змішаних культурах бактерій. *P. aeruginosa* використовують QS для координації їх популяційної поведінки за допомогою дії позаклітинних сигнальних молекул, таких як N-ацил-1-гомосерін лактони (AHL), які використовують в якості аутоіндукторів. *P. aeruginosa* продукує ще один аутоіндуктор, міжклітинний сигнал відмінний від AHL – 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (PQS), який відноситься до родини 4-гідрокси-2-алкілхінолонів (HAQ).

Однак, завдяки певним методам, наприклад метод електророзпилюючої іонізації та метод рідинної хроматографії і тандемної мас-спектрометрії (LCMS), можливо отримати синтетичні аналоги сигнального хінолону *P. aeruginosa*, які як з'ясувалося в дослідженнях [Deziel, 2004], мають певні антимікробні властивості за відношенням до грампозитивних бактерій, наприклад бактерії роду *Staphylococcus*.

Розуміння принципу дії антимікробної активності аналогів PQS є визначальним фактором в боротьбі з різними патогенними бактеріями, що на сьогоднішній день є особливо актуальним за відношенням до інфекцій, асоційованих з імплантатами, потрібних людині препаратів в біотехнології, моделюванні певних процесів поведінки мікроорганізмів.

Мета даної роботи - дослідити чутливість біоплівки різних штамів *Staphylococcus aureus* до синтетичних аналогів сигнального хінолону (PQS).

Для досягнення даної мети були поставлені наступні задачі:

1. Визначити здатність штамів *S. aureus* ONU 223, ONU 443 та ONU 536 до утворення біоплівки;
2. Дослідити чутливість планктонних клітин *S. aureus* в системі планктон-біоплівка до синтетичних аналогів PQS;
3. Дослідити чутливість клітин біоплівки *S. aureus* до синтетичних аналогів PQS.

Об'єкт дослідження – антимікробні властивості синтетичних аналогів сигнального хінолону.

Предмет дослідження – чутливість біоплівкових культур штамів *Staphylococcus aureus* 223, *Staphylococcus aureus* 443, *Staphylococcus aureus* 536 до синтетичних аналогів сигнального хінолону.

ВИСНОВКИ

1. PQS та його аналоги C3Q і C5Q за умов впливу на процес утворення біоплівки знижують кількість планктонних клітин *S. aureus* 223, і *S. aureus* 443 у 1,6-6 разів. Сполука iC3Q, яка має розгалужений алкільний радикал, не чинила впливу на цей показник.
2. На рівень планктонних клітин *S. aureus* 536 впливав лише сигнальний хінолон, який знижував їх кількість на 23%. Синтетичні аналоги виявилися неактивними.
3. Встановлено різноспрямований вплив досліджених сполук на утворення біоплівки штамами *S. aureus* 223, 443 і 536. PQS та його синтетичні похідні C3Q і C5Q інгібували формування біоплівки *S. aureus* 223 і дещо стимулювали цей процес у двох інших штамів.
4. Аналоги сигнального хінолону зі скороченим алкільним ланцюгом практично не впливали на зрілі біоплівки досліджуваних штамів стафілококків.
5. Похідні PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга (C8Q, C9Q і C11Q) є ефективними інгібіторами процесу утворення біоплівки усіма штамами та сприяють деструкції зрілих біоплівок.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бухарин О.В. Механизмы выживания бактерий / О. В. Бухарин, Ю.М. Романова, А. Л. Гинцбург // – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
2. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas spp.* и сходных микроорганизмов // Инф. антимикроб. тер. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 1-16.
3. Ильина Т. С. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности // Мол. генетика, микробиол. вирусол. – 2006. – № 3. – С. 22-29.
4. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel/ С.Н Лапач, А.В Чубенко, П.Н Бабич // К.: Морион, 2001. – 260 с.
5. Маянский А. Н. Межвидовые взаимодействия бактерий и образование смешанной (полимикробной) биопленки // Журн. микробиол. – 2012. – № 1. – С. 93-101.
6. Руднов В.А. Антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных *P. aeruginosa* // Рус. мед. журнал. – 2005. – Т. 13, № 7. – С. 485-490.
7. Сидоренко С.В. Клиническое значение *Pseudomonas aeruginosa* // Клин. фармакол. и тер. – 2003. – Т. 12, № 2. – С. 1-7.
8. Al-Bakri A. Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities // J. Appl. Microbiol. – 2004. – V. 96 – P. 455-463.
9. Barros E.M., Ceotto H., Bastos M.C., dos Santos K.R., Giambiagi-deMarval M. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. // J. Clin. Microbiol. – 2012. – V.50. – P. 166–168.

10. Bathoorn E, Hetem D.J., Alphenaar J., Kusters J.G., Bonten M.J. Emergence of high-level mupirocin resistance in coagulase-negative *staphylococci* associated with increased short-term mupirocin use // J. Clin. Microbiol. – 2012. – V.50. – P. 2947–2950.
11. Biswas L. Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa* / L. Biswas, R. Biswas, M. Schlag. // Appl. Environ. Microb –2009. – V.75 – P. 6910 – 6912.
12. Bredenbruch F. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines // J. of Bacteriology. – 2005. – V.187 – P. 28788–28794.
13. Calfee M. Interference with *Pseudomonas* Quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98 – P. 11633-11637.
14. Chen F., Di H., Wang Y., Cao Q., Xu B., Zhang X., Yang N, Liu G, Yang CG, Xu Y, Jiang H, Lian F, Zhang N, Li J, Lan L. Small-molecule targeting of a diapophytoene desaturase inhibits *S. aureus* virulence. // Nat. Chem. Biol. – 2016. – V.12. – P. 174–179.
17. Coleman J. *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. // J. of Bacteriol – 2008 – V. 190 – P. 1247–1255.
18. Conway C. Co-cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Roseobacter denitrificans* reveal shifts in gene expression levels compared to solo cultures // Sci. World Journal. – 2012. – V.10 – P. 1201 – 1208.
19. Deziel E. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. // Proc. of the Nat. Academy of Sciences of the United States of America – 2004. – V. 101 - P. 1339 – 1344.

20. Diggle S. Functional genetic analysis reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria // Chemistry & Biology – 2006. - V. 13 - P.701 - 710.
21. Falagas M.E., Maraki S., Karageorgopoulos D.E., Kastoris A.C., Kapaskelis A., Samonis G. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive non-urinary isolates to fosfomycin // Int. J. Antimicrob. Agents – 2010. – V.35. – P. 497–499.
22. Fazli M., Bjarnsholt T., Kirketerp-Moller K., Jorgensen A., Andersen C. B. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. Wound Repair Regen. – 2011. – V.19. – P. 387–391.
23. Filkins L. M. Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* drives *S. aureus* towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model / L. M. Filkins, J.A. Graber, D. G. Olson, E. L. Dolben, L.R. Lynd, S. Bhuju, G. A. O'Toole // J. Bacteriol. –2015 – V. 197 – P. 2252 – 2264.
24. Garvis S. *Staphylococcus aureus* svrA: a gene required for virulence and expression of the agr locus / S. Garvis, et. al. // Microbiology. – 2002. – V. 148 – P. 3235–3243.
25. Gruber J. The role of 2,4-dihydroxyquinoline (DHQ) in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity /J. Gruber,W. Chen, S. Parnham, K. Beauchesne // Peer J. – 2016. – V.4.
26. Gu B., Kelesidis T. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. J. Antimicrob. Chemother. – 2013. – V.68. – P. 4–11.
27. Guo L., Xu R., Zhao Y., Liu D., Liu Z., Wang X., Chen H., Gas plasma pre-treatment increases antibiotic sensitivity and persister eradication in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. // Front. Microbiol. - 2018. – V. 9. – P. 537.

- 28.Hammad A.M., Watanabe W., Fujii T., Shimamoto T. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish // Int. J. Food Microbiol. – 2012. – V.156. – P. 286–289.
- 29.Harrison F.Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections // BMC Biology. – 2006. – V. 4 – P. 21.
- 30.Heeb S. Quinolones: from antibiotics to autoinducers / S. Heeb, M. Fletcher, S. Chhabra // FEMS Microbiol Rev. – 2011. – V.35 – P. 247–274.
- 31.Hu Q., Peng H., Rao X. Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. // Front. Microbiol. - 2016. – V. 7. – P. 1601.
- 32.Iorio N.L., Azevedo M.B., Frazão V.H., Barcellos A.G., Barros E.M., Pereira E.M., de Mattos C.S., dos Santos K.R. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. Int. Microbiol. – 2011. – V.14. – P. 13–17.
- 33.Kerr J. Phenazine pigments, antibiotics and virulence factors // The infectious disease review - microbes of man, animals and the environment. – 2000. – V. 2 – P. 184-194.
- 34.Kimata N. *Pseudomonas aeruginosa* isolated from marine environments in Tokyo Bay // Microb. Ecol. – 2004. – V. 47 – P. 41-47.
- 35.Lau G.W. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection // Trends Mol. Med. – 2004. – V. 10 – P. 599-606.
- 36.Lépine F.Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*/ F. Lépine, E. Déziel // J. Am. Soc. Mass. Spectr. - 2004. – V.15 – P. 862–869.

37. Machado I.M. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *E. coli* biofilms to benzalkonium // J. Basic Microbiol. – 2012. – V. 52 – P. 43-52.
38. McKnight S. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *P. aeruginosa* / S. McKnight, B. Iglewski, E. Pesci// J. Bacteriol. – 2000. – V. 182 – P. 2702-2708.
39. Michel-Briand Y. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Michel-Briand, C. Baysee // Biochimie. – 2002. – V. 84 – P. 499-510.
40. Morales D. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines // mBio. – 2013. – V. 4 – P. 1-9.
41. Musthafa K.S., Sivamaruthi B. S., Pandian S.K., Ravi A.V. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by antagonistic compound phenylacetic acid // Current Microbiology, - 2012. – V. 65. – P. 475–480.
42. Orazi G. *Pseudomonas aeruginosa* alters *Staphylococcus aureus* sensitivity to Vancomycin in a biofilm model of Cystic Fibrosis Infection / G. Orazi, G. A. O'Toole// mbio — 2017 – V.8(4).
43. Pan X.S. Small-colony mutants of *Staphylococcus aureus* allow selection of gyrase-mediated resistance to dual-target fluoroquinolones / X. Pan, P. Hamlyn, R. Talens-Visconti // Antimicrob. Agents Ch. - 2002. – V.46 – P. 2498–2506.
44. Pastar I., Nusbaum A.G., Gil J., Patel S.B., Chen J., Valdes J. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. PLoS ONE. – 2013. – V.8.
45. Pelz A., Wieland K. P., Putzbach K., Hentschel P., Albert K. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. // J. Biol. Chem. – 2005. – V.28, - P. 32493–32498.

46. Petrelli D. Analysis of meticillin-susceptible and meticillinresistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital // J. of Med. Microb. – 2008. – V.57 – P. 364–372.
47. Rezaei E., Safari H., Naderinasab M., Aliakbarian H. Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity // Burns. - 2011. – V. 37. – P. 805–807.
48. Russell A.B., Hood R.D., Bui N.K., LeRoux M., Vollmer W. Mougous J. D. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells // Nature. - 2011. – V. 475. - P. 343–347.
49. Schertzer J. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH/ J. Schertzer, S. Brown, M. Whiteley // Molecular Microbiology – 2010. – V.77 – P. 1527–1538.
50. Seth A. K., Geringer M.R., Galiano R.D., Leung K.P., Mustoe T.A. Quantitative comparison and analysis of species - specific wound biofilm virulence using an in vivo, rabbit - ear model // Journal of the American College of Surgeons. – 2012. - V. 215. – P. 388–399.
51. Shen J., Wang Y., Schwarz S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. J. Antimicrob. Chemother. – 2013. – V. 68. – P. 1697–1706.
52. Smith R. *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence / R. Smith, B. Iglewski // Cur. Opin. Microbiol. – 2003. – V. 6 – P. 56-60.
53. Somanathan R. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids / R. Somanathan, K.M. Smith// J. heterocycl. Chem. – 1981. – V. 18. – № 6. – P. 1077-1079.
54. Tomasini A., Francois P., Howden B. P., Fechter P., Romby P. , Caldelari I. The importance of regulatory RNAs in *Staphylococcus aureus* // Infection Genetics and Evolution. - 2014. – V. 21. – P. 616 – 626.

55. Tomlin K.L. Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* / K. Tomlin, O. Coll, H. Ceri // Can. J. Microbiol. – 2001. – V. 47 – P. 949-954.
56. Tormo M.A. Phase-variable expression of the biofilm-associated protein (Bap) in *S. aureus* / M. A'ngeles Tormo, [et. al.] // Microbiology. – 2007. – V.153 – P.1702–1710.
57. Traber K. agr function in clinical *S. aureus* isolates / E. Katrina, E. Traber // Microbiology. – 2008. – V. 154 – P. 2265–2274.
58. Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Crombé F, Dispas M. Species and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) diversity among methicillin-resistant *non-S. aureus* staphylococci isolated from pigs // Vet. Microbiol. – 2012. - V. 158. – P. 123–128.
59. Voggu L., Microevolution of cytochrome *bd* oxidase in *Staphylococci* and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas* / L. Voggu, S. Schlag, R. Biswas// J Bacteriol. - 2006. – V.188 – P. 8079–8086.
60. Williams J.S. Characterization of bioactive secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* and porocentrum species // Microbiology.– 2003. – 91 pp.
61. Yang Y. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2011. – V. 62 – P. 339-347.
62. Zapotoczna M., McCarthy H., Rudkin J. K. O'Gara J. P. An Essential Role for Coagulase in *S. aureus* Biofilm Development Reveals New Therapeutic Possibilities for Device - Related Infections // Infect. Dis. J. – 2015. – V. 212. - P. 1883–1893.
63. Zhang Y. PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *P. aeruginosa* / Y. Zhang, M. Frank// J. of Biol. Chem. – 2008. – V.283 – P. 28788–28794.