

УДК 615.281:547.831.7

І.О. Малярчик, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: igormal85@mail.ru

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *SALMONELLA ENTERITIDIS* І *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЗА ПРИСУТНОСТІ ПОХІДНИХ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ

Показано, що накопичення біомаси Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis і Pseudomonas aeruginosa у планктонних культурах і формування ними біоплівки дозо-залежно зменшується в присутності N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (сполука I) та його похідних з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV). Утворення біоплівки стафілококом однаково гальмується всіма сполуками незалежно від їх структури. У той же час, аналоги з нуклеофільними замісниками були більш активними у порівнянні зі сполукою I щодо грамнегативних бактерій. Найбільш висока активність сполук III і IV зареєстрована при їх використанні у концентрації 80 мкМ. При цьому формування біоплівки S. aureus гальмується у 5,4 разу, P. aeruginosa – у 8,4 разу, S. enteritidis – у 4,9 разу.

Ключові слова: біоплівка, біомаса планктонної культури, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками.

Виявлення в останні часи нових видів активності у сульфаніламідів поновило інтерес до цієї групи антимікробних засобів. Сьогодні у світі численні лабораторії синтезують та вивчають властивості нових аналогів цих препаратів, що є свідченням актуальності цієї проблеми [4, 8–10].

Раніше нами була встановлена антимікробна дія нових аналогів сульфаніламідів, а саме N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних з нуклеофільними замісниками у фенільному кільці [2]. Крім того, було показано, що *пара*-амінобензойна кислота практично не зменшує антимікробний ефект цих сполук. Ці результати свідчать про наявність у похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів інших механізмів дії, ніж притаманна відомим препаратам здатність конкурентно інгібувати бактеріальну дігідроптероатсинтазу [3, 7]. Ймовірною мішенню може виступати система quorum sensing, яка контролює множинні фактори патогенності, міжклітинну комунікацію, утворення біоплівки тощо [6].

© І.О. Малярчик, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, 2010



Метою даної роботи було дослідження формування біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Salmonella enteritidis* var. Isatchenko ВНИИСХМ 18/1 отримані з колекції культур кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Зберігання тест-штамів проводили на поверхні скошеного м'ясопептонного агару (МПА) при температурі 4 °С. Для експерименту використовувались добові культури, що вирощувались у пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Інкубацію усіх культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми "Nunclon". У кожен лунку додавали по 1 мл суспензії клітин, яка містила 10^3 КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали планктонні культури і спектрофотометрично оцінювали накопичення в них біомаси при 540 нм. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Біоплівки забарвлювали водними розчинами кристалічного фіолетового на протязі 5 хв при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 години за кімнатної температури та заливали лізуючим розчином, що містив 0,1 N NaOH і 1% SDS, по 1 мл у кожен лунку. Планшети витримували 1,5–2 години до повного лізису біоплівки за кімнатної температури. Інтенсивність формування біоплівки визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків на спектрофотометрі "Спекол-10" при довжині хвилі 592 нм [5].

Про інгібування утворення біоплівки тест-штамами судили по наявності різниці оптичної густини між дослідними і контрольними зразками з подальшим розрахунком *biofilm index* (BI) за формулою [11]:

$$BI = OD_{592}(\text{кристалічний фіолетовий}) \cdot \frac{OD_{592}(\text{планктон})}{OD_{592}(\text{посівна доза})}$$

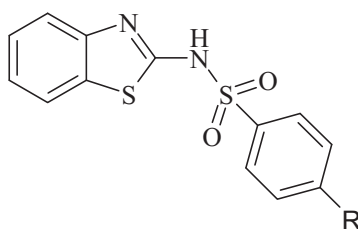
У роботі як планктонні позначені культури, що знаходилися у рідкому середовищі над біоплівкою. Суспензійними вважали рідкі культури, які вирощувались у пробірках і не утворювали біоплівки.

Усі експерименти повторювали 3 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 6. Для обробки та аналізу даних використовували методи варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стюдента. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [1].



Результати та їх обговорення

У роботі використовували синтезовані в Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід (сполука I, R=H) та його похідні з нуклеофільними замісниками: R=Cl (II), R=F (III), R=NO₂ (IV):



Кінцеві концентрації досліджуваних сполук у середовищі становили 0,4; 4; 40 та 80 мкМ.

При вивченні дії нових аналогів сульфаніламідів використовували три штами бактерій — *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa*, з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ.

Отримані результати (табл.) свідчать, що усі досліджувані сполуки здатні інгібувати накопичення біомаси тест-мікроорганізмів у планктоні при їх культивуванні в умовах, які забезпечують утворення біоплівки. Причому спрямованість цих змін в залежності від концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду була подібна до тієї, що спостерігалася у суспензійних культурах [2].

Для *S. aureus* встановлено залежне від концентрації зниження накопичення біомаси в присутності усіх похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду. При цьому для сполук II, III, IV, які містять нуклеофільні замісники, не спостерігалася значних відмінностей у рівні антимікробної дії в порівнянні зі сполукою I. За найменшої з використаних концентрацій (0,4 мкМ) інгібуючий ефект складав 25–35%. За присутності досліджуваних похідних у концентрації 80 мкМ кількість біомаси стафілококу зменшувалася у 2,2–2,8 разів.

Для грамнегативних бактерій спостерігалася інша картина. У цих випадках, особливо при високих концентраціях, виявлено більш значне пригнічення накопичення біомаси за дії похідних з нуклеофільними замісниками. Кількість біомаси *P. aeruginosa* за дії сполуки I у концентрації 80 мкМ була нижчою у порівнянні з контролем в 1,76 разу, а за дії сполук II, III і IV — у 3,34, 5,55 та 6,26 разу, відповідно.

Для *S. enteritidis* встановлено таку саму закономірність, хоча її чутливість до досліджених похідних бензотіазолу була дещо нижчою у порівнянні з *P. aeruginosa*: накопичення біомаси стримувалося за присутності більшої концентрації сполук I–IV у 1,7, 2,2, 2,57 і 2,79 разів.



Таблиця

Накопичення біомаси ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$) у планктонних культурах за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Table

Biomass accumulation ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$) in planktonic cultures in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Мікро-організм	Сполука	Концентрація, мкМ			
		0,4	4,0	40,0	80,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	К	542±29	542±29	542±29	542±29
	I	407±38	358±33	255±28*	189±23*
	II	352±40	309±34	217±26*	228±35*
	III	358±37	293±32	233±28*	216±25*
	IV	357±35	282±30	249±31*	238±22*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	К	1815±103	1815±103	1815±103	1815±103
	I	1325±126	1144±121	1016±134	1029±127
	II	1129±130	944±105	871±86*	544±67*
	III	1071±119	889±93	617±76*	327±45*
	IV	1068±126	780±83	545±66*	290±37*
<i>Salmonella enteritidis</i>	К	734±38	734±38	734±38	734±38
	I	624±58	484±50	455±42	433±39
	II	565±61	462±52	408±48*	334±47*
	III	440±43	382±38	330±38*	286±31*
	IV	536±60	404±45	272±33*	263±27*

Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна
 Note: К – control; * – significant different from control

Однак аналоги з нуклеофільними замісниками і в цьому випадку виявилися більш ефективними (на 15–25%), ніж N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід.

Результати визначення впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на утворення досліджуваними бактеріями біоплівки наведені на рис. 1–3. Отримані дані показали, що досліджувані мікроорганізми відрізняються один від одного не тільки накопиченням біомаси (табл.), але й інтенсивністю формування біоплівки. Відповідні індекси



дорівнюють: $4,3 \pm 0,3$ для *S. aureus*, $6,7 \pm 0,5$ для *P. aeruginosa* і $5,4 \pm 0,5$ для *S. enteritidis*.

Вже за меншої концентрації досліджуваних сполук спостерігається інгібування утворення біоплівки. Кількісні зміни в залежності від структури сполук становлять 26–35% у разі стафілококу, 16–36% — псевдомонади, 10–35% — сальмонели. Зростання концентрацій призводить до сповільнення процесу формування біоплівки і починаючи з концентрації сполук 4 мкМ результати вірогідно відрізняються від показників контролю для кожного з мікроорганізмів. Для *S. aureus* практично не спостерігається відмінностей між ефектами N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних при одній і тій же концентрації (рис. 1).

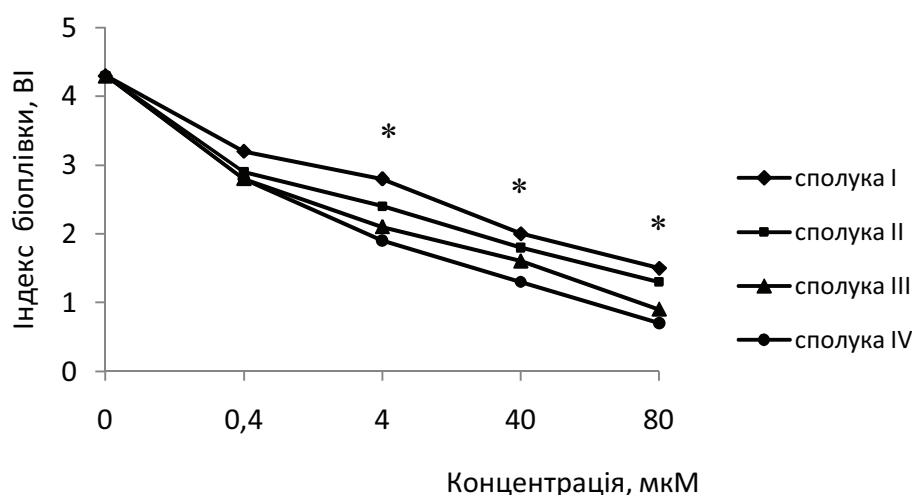


Рис. 1. Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів
Примітка: К — контроль; * — різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук

Fig. 1. *Staphylococcus aureus* biofilm formation in presence of N-benzothiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K — control; * — significant different from control for all compounds

На відміну від стафілококу для двох інших мікроорганізмів встановлена різна чутливість процесу утворення біоплівки до дії різних сполук. Так, починаючи з концентрації 4 мкМ сполуки III і IV виявляють більш високу активність у порівнянні зі сполуками I і II (рис. 2 і 3). Подальше підвищення концентрацій викликає ще більші відмінності і ефекти III і IV вірогідно відрізняються від дії сполуки I.



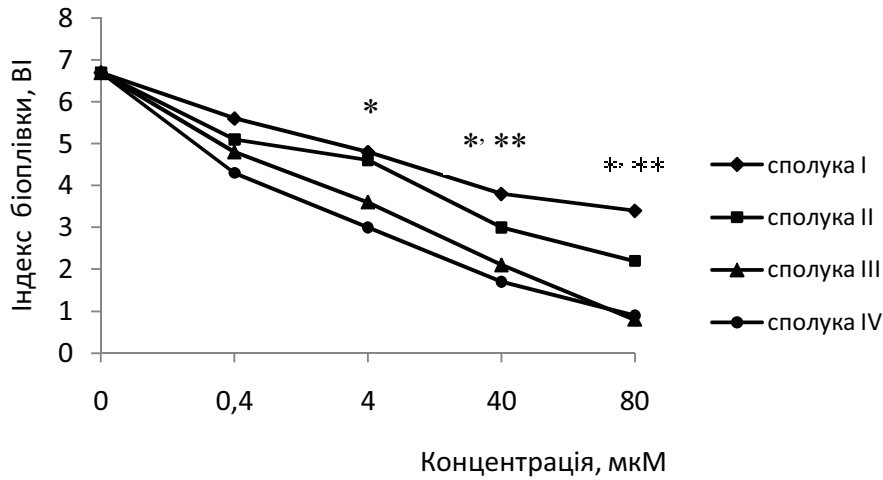


Рис. 2. Утворення біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів
Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук; ** – різниця для сполук III і IV вірогідна у порівнянні зі сполукою I

Fig. 2. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K – control; * – significant different from control for all compounds; ** – data for compounds III and IV significant different from data for compound I

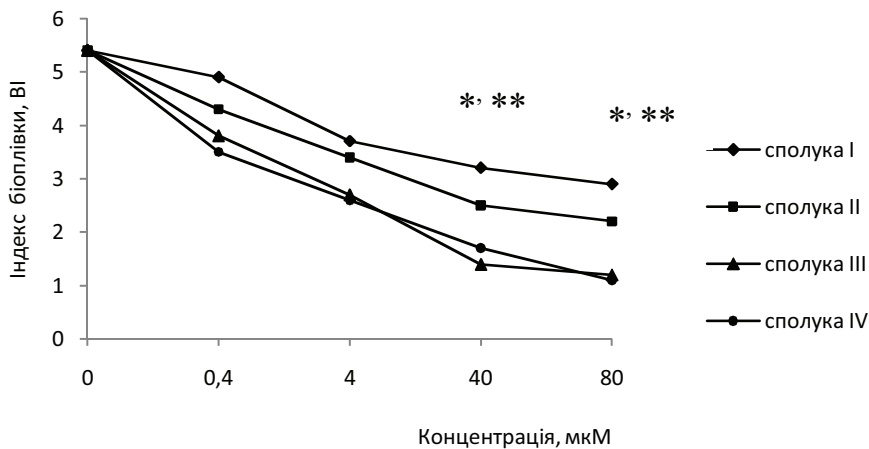


Рис. 3. Утворення біоплівки *Salmonella enteritidis* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук;

** – різниця для сполук III і IV вірогідна у порівнянні зі сполукою I

Fig. 3. *Salmonella enteritidis* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K – control; * - significant different from control for all compounds; ** – data for compounds III and IV significant different from data for compound I

П'ятдесятивідсоткове пригнічення формування біоплівки сполуками III і IV досягається вже при їх концентрації 4 мкМ. Для двох інших сполук воно спостерігається при більших концентраціях. Слід відмітити, що *S. aureus* виявив більш значну чутливість до сполуки I в порівнянні з грамнегативними бактеріями. Процес утворення біоплівки стафілококом при максимальній з досліджених концентрацій цієї сполуки гальмується майже у 3 рази, тоді як у псевдомонади и сальмонели лише удвічі.

Найбільш висока активність сполук III і IV зареєстрована при їх використанні у концентрації 80 мкМ. При цьому формування біоплівки *S. aureus* гальмується у 5,4 разу, *P. aeruginosa* — у 8,4 разу, *S. enteritidis* — у 4,9 разу.

Таким чином, отримані результати, на прикладі пригнічення похідними N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів процесу утворення біоплівки, показали, що можливим механізмом дії цих сполук є вплив на систему quorum sensing. Для остаточного вирішення цього питання доцільно встановити зміни у досліджуваних мікроорганізмів також інших властивостей, що контролюються цією системою.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
2. Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Вострова Л.М., Гренадьорова М.В. Антимікробні властивості N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів і його аналогів з нуклеофільними замісниками // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 3. — С. 40–49.
3. Падейская Е.Н. Комбинированные антибактериальные препараты на основе производных сульфаниламида и диаминопиримидина // Новые лекарственные препараты, сб. трудов ВНИХФИ. — 1991. — С. 94–104.
4. Bergan T., Ortengren B., Westerlund D. Clinical pharmacokinetics of co-trimazine // Clin. Pharmacokinet. — 1986. — V. 11. — P. 372–386.
5. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. — 1985. — V. 22. — № 6. — P. 996–1006.
6. Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // J. Clin. Invest. — 2003. — V. 112. — P. 1300–1307.
7. Ives H.E. Basic and clinical pharmacology // Lange Basic Science — New York, 2004. — P. 241–259.
8. Mengelers M.J., Hougee P.E., Janssen L.H., Van Miert A.S. Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemi-



cal properties of sulfonamides // *Vet. Pharmacol. Ther. J.* — 1997. — V. 20, № 4. — P. 276–283.

9. *Rana A., Siddiqui N., Khan S.A.* Benzothiazoles: A new profile of biological activities // *Indian J. Pharm. Sci.* — 2007. — V. 69. — P. 10–17.

10. *Richards R.M, Taylor R.B, Zhu Z.Y.* Mechanism for synergism between sulphonamides and trimethoprim clarified // *Pharm. Pharmacol. J.* — 1996. — V. 48, № 9. — P. 981–984.

11. *Tolker-Nielsen T.* Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms // *J. Bacteriol.* — 2000. — V. 182. — P. 6482–6489.

И.О. Малярчик, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: igormal85@mail.ru

**ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
SALMONELLA ENTERITIDIS И *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA В ПРИСУТСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ
N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОАМИДА**

Реферат

Показано, что накопление биомассы *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Pseudomonas aeruginosa* в планктонных культурах и формирование ими биопленки дозо-зависимо уменьшается в присутствии N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида (соединение I) и его производных с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV). Образование биопленки стафилококком одинаково подавляется всеми соединениями независимо от их структуры. В то же время, аналоги с нуклеофильными заместителями были более активными по сравнению с соединением I в отношении грамотрицательных бактерий. Наибольшая активность соединений III и IV зарегистрирована при концентрации 80 мкМ. При этом формирование биопленки *S. aureus* подавляется в 5,4 раза, *P. aeruginosa* — в 8,4 раза, *S. enteritidis* — в 4,9 раза.

К л ю ч е в ы е с л о в а : биопленка, биомасса планктона, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями.



I.O. Maliarchyk, T.O. Filipova, B.M. Galkin

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: igormal85@mail.ru

**BIOFILM FORMATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
SALMONELLA ENTERITIDIS AND *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* IN PRESENCE
OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-BENZENSULFONAMIDE
DERIVATIVES**

Summary

It was shown that the growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* decreased in the presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide (compound I) and its derivatives with nucleophylic radicals (compounds II, III and IV) in depending on a dose manner. The inhibitory effect of these compounds on *S. aureus* did not depend on their structures. At the same time, the derivatives with nucleophylic radicals were more effective against gram-negative bacteria then compound I. Biofilm formation by *S. aureus* was inhibited by all the compounds and was not dependent on their structure. In the same time analogs with nucleophylic derivatives showed higher activity on gram-negative bacteria biofilm instead compound I. The highest activity for compounds III and IV were detected in concentration of 80 mkM. In this case *S. aureus* biofilm was inhibited by the 5.4 times, *P. aeruginosa* – by 8.4 times, *S. enteritidis* – by 4.9 times.

Key words: biofilm, plankton biomass, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals.

