

УДК 579.222:579.262

Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ И СИНТЕЗ РАМНОЛИПИДОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 В ПРИСУТСТВИИ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА И ЕГО СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ

Цель. Оценка влияния экзогенного сигнального хинолона (*Pseudomonas Quinolone Signal* – PQS) – одного из аутоиндукторов системы quorum sensing у *Pseudomonas aeruginosa* – и его синтетических аналогов на синтез рамнолипидов. **Методы.** Клетки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 инкубировали 24 часа в 48-луночных планшетах «Nunclon» в присутствии синтетических аналогов 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS), или его синтетических аналогов (2-октил-, 2-нонил-, или 2-лаурил-3-гидрокси-4-хинолона). Конечные концентрации соединений содержали от 10 до 120 мкМ. Содержание рамнолипидов определяли по реакции с орциновым реактивом. **Результаты.** Показано, что экзогенный PQS в концентрациях 40, 60 и 80 мкМ вызывает возрастание уровня рамнолипидов в 1,9; 3,3 и 5,2 раза, соответственно. Повышение концентрации сигнального хинолона до 100 и 120 мкМ снижает его стимулирующее действие на 26% и 50% по сравнению с уровнем, который был зарегистрирован при 80 мкМ PQS. При этой концентрации количество планктонных клеток увеличивается в 3,4 раза, а масса биоплёнки вдвое. Активность синтетических аналогов зависит от числа атомов углерода в ацильной цепи: октил-хинолон (C_8) > нонил-хинолон (C_9) > лаурил-хинолон (C_{11}). Наибольшее повышение уровня биосурфактантов отмечено в присутствии 80 мкМ октил-хинолона – на 65%. Два других аналога увеличивают его на 35% и 20%. **Выводы.** Оптимальная концентрация сигнального хинолона (PQS), которая максимально повышает синтез рамнолипидов, составляет 80 мкМ. Исследованные синтетические аналоги PQS уступают ему в способности активировать синтез биосурфактантов *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключевые слова: рамнолипиды, PQS, синтетические аналоги PQS, *Pseudomonas aeruginosa*.

Рамнолипиды – биосурфактанты, продуцируемые бактериями рода *Pseudomonas*, а также некоторыми представителями других родов и семейств [4], благодаря своим физико-химическим свойствам находят широкое практическое применение. Они не уступают химическим сурфактантам по эмульгирующей способности [3,8], что дает возможность

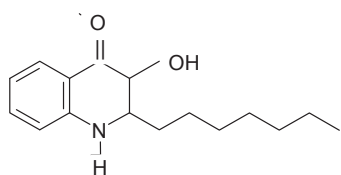
© Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, Т.О. Филиппова, 2013



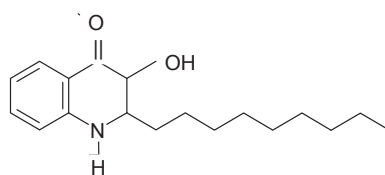
ефективно використовувати їх для біоремедиації забруднених ґрунтів [11], підвищення нафтоотдачі [17]. Крім того, вони мають антимікробну активність [16], використовуються в косметології, виробництві засобів побутової хімії [5]. Особливий інтерес представляє їх застосування як лікарських засобів в онкології та дерматології [14]. Практичне використання рамноліпідів обмежене високою вартістю їх виробництва. В зв'язі з цим, актуальною задачею є оптимізація процесів отримання біосурфактантів та підвищення виходу кінцевих продуктів. В даний час для цього використовують декілька підходів: вибір оптимального складу культуральних середовищ, селекція надпродукентів, генна інженерія [10]. Враховуючи, що синтез рамноліпідів відбувається під контролем системи міжклітинної комунікації (*quorum sensing*) і, зокрема, її *rhl*-зв'язки [12,13] представляє перспективний підхід, оснований на активації функціонування даної системи. Метою даної роботи було оцінити вплив екзогенного сигнального хінолону (PQS) — одного з аутоіндукторів системи *quorum sensing* у *Pseudomonas aeruginosa* — та його синтетических аналогів на синтез рамноліпідів.

Матеріали та методи

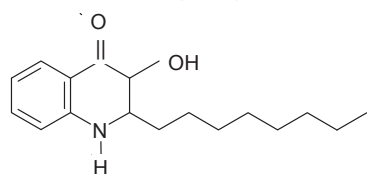
В роботі використовували штамп *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (ONU 300) з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Сигнальний хінолон (PQS) та його синтетическі аналоги, що відрізняються довжиною ацильної ланцюга, були синтезовані в Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І.І. Мечникова:



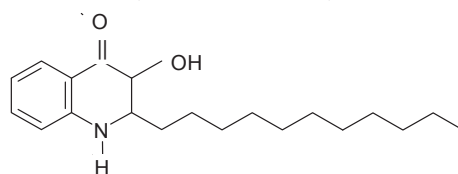
2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон
(PQS)



2-ноніл-3-гідрокси-4-хінолон
(ноніл-хінолон)



2-октил-3-гідрокси-4-хінолон
(октил-хінолон)



2-лаурил-3-гідрокси-4-хінолон
(лаурил-хінолон)

Исследования проводили в системе планктон—биоплёнка в 48-луночных полистироловых плоскодонных планшетах «Nunclon». Суточную культуру *P. aeruginosa* разводили стерильным физиологическим раствором и вносили в лунки планшетов, содержащих по 1 мл среды Гиса до конечной концентрации 10^3 клеток/мл. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. Для оценки эффектов PQS и его синтетических аналогов их добавляли в лунки планшетов до конечных концентраций 10–120 мкМ.

Через 24 часа из каждой лунки тщательно отбирали планктонные культуры и спектрофотометрически оценивали количество клеток при длине волны 540 нм. Биоплёнки на дне лунок отмывали физиологическим раствором и фиксировали 96% этанолом в течение 10 мин [15]. Затем их окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 5 мин при комнатной температуре. Планшеты с окрашенной биоплёнкой высушивали 24 часа при комнатной температуре и добавляли в каждую лунку по 1 мл лизирующего раствора, содержащего 1% додецилсульфата натрия в 0,1 М NaOH. Планшеты выдерживали 1,5 часа при комнатной температуре до полного растворения биоплёнки. Количество кристаллического фиолетового определяли по оптической плотности опытных и контрольных образцов на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary) при длине волны 592 нм.

Рамнолипиды из супернатанта, полученного после центрифугирования культур при 1500 g, осаждали после доведения рН до 6,5 75 мМ раствором $ZnCl_2$ [7]. Через 20 мин преципитат растворяли в 0,1 М натрий фосфатном буфере (рН 6,5). Полученные растворы дважды экстрагировали 5 мл хлороформа. Органическую фазу отбирали в чистые 20 мл флаконы и испаряли насухо. Осадок на дне флаконов растворяли в 100 мкл метанола.

Количество рамнолипидов в образцах определяли с помощью орцинового теста. К 100 мкл образца рамнолипидов в метаноле добавляли 400 мкл H_2O и 500 мкл орцинового реактива. Реакционную смесь кипятили на водяной бане 20 мин до изменения окраски с жёлтой на зелёную и измеряли экстинкцию контрольных и опытных образцов при длине волны 670 нм [9].

Все эксперименты проводили трижды с 6 повторами в каждом.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационного анализа. Рассчитывали средние значения показателей (\bar{X}) и их стандартную ошибку ($S_{\bar{X}}$). Достоверность отличий между средними определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ($p \leq 0,05$). Математические расчеты осуществляли с помощью компьютерной программы Excel [2].

Результаты и их обсуждение

Учитывая, что синтез рамнолипидов находится у *Pseudomonas aeruginosa* под контролем системы межклеточной коммуникации, ис-



слідования проводили в умовах, сприяючих активації всіх звеньїв *quorum sensing*. Отримані результати (рис. 1) показали, що екзогенний сигнальний хінолон підвищує синтез біосурфактанта, починаючи з концентрації 40 мкМ. Менші концентрації PQS помітного ефекту не мали. В діапазоні концентрацій 40–80 мкМ спостерігається пропорційне збільшення синтезу рамноліпідів. Їх рівень зростає в 1,9; 3,3 і 5,2 рази в присутності 40, 60 і 80 мкМ PQS, відповідно. Далі збільшення концентрації сигнального хінолона знижує його стимулюючий ефект. При концентраціях 100 і 120 мкМ вміст рамноліпідів в супернатанті зменшується на 26% і 50% порівняно з максимальним рівнем, який спостерігався при 80 мкМ. Зміни двох інших показників: кількості планктонних клітин і маси біоплівки, мають такий же характер. В присутності 80 мкМ PQS кількість планктонних клітин зростає в 3,4 рази, а маса біоплівки вдвічі порівняно з контролем. Більш низький рівень приросту біоплівки порівняно з планктонними клітками пов'язано, згідно з даними, з високим вмістом рамноліпідів, які сприяють відокремленню кліток від біоплівки і їх переходу в рідку фазу [6].

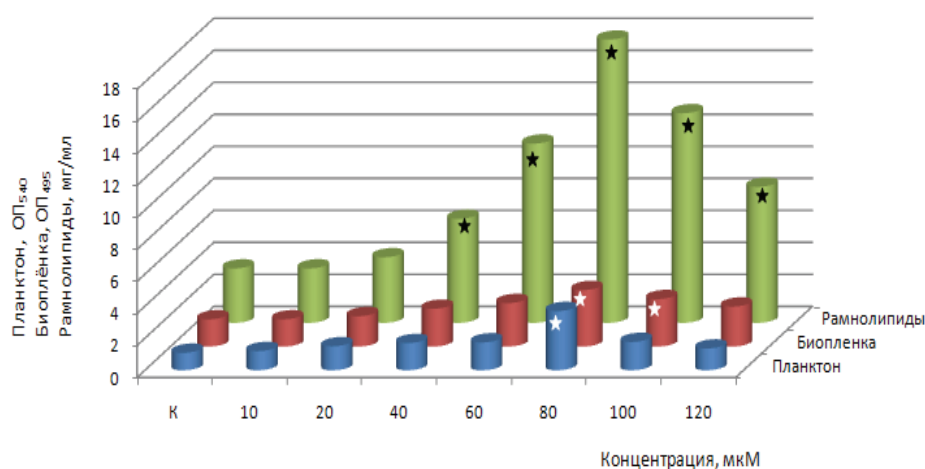


Рис. 1. Синтез рамноліпідів в системі планктон–біоплівка в присутності екзогенного PQS

Примечание: ★ — различия достоверны по сравнению с контролем

Fig. 1. Rhamnolipids biosynthesis in plankton–biofilm system in presence of exogenous PQS

Note: ★ — the differences were significant in comparison with control

Синтетические аналоги сигнального хінолона також підвищують синтез рамноліпідів, однак їх ефективність суттєво нижче порівняно з PQS (рис. 2).

Активность синтетических аналогов зависит от числа атомов углерода в ацильной цепи: октил-хинолон (C_8) > нонил-хинолон (C_9) > лаурил-хинолон (C_{11}). Наибольшее увеличение уровня биосурфактантов отмечено в присутствии 80 мкМ октил-хинолон — на 65%. Два других аналога (нонил- и лаурил-хинолоны) повышают его на 35% и 20%. Количество планктонных клеток при внесении в среду культивирования этих веществ

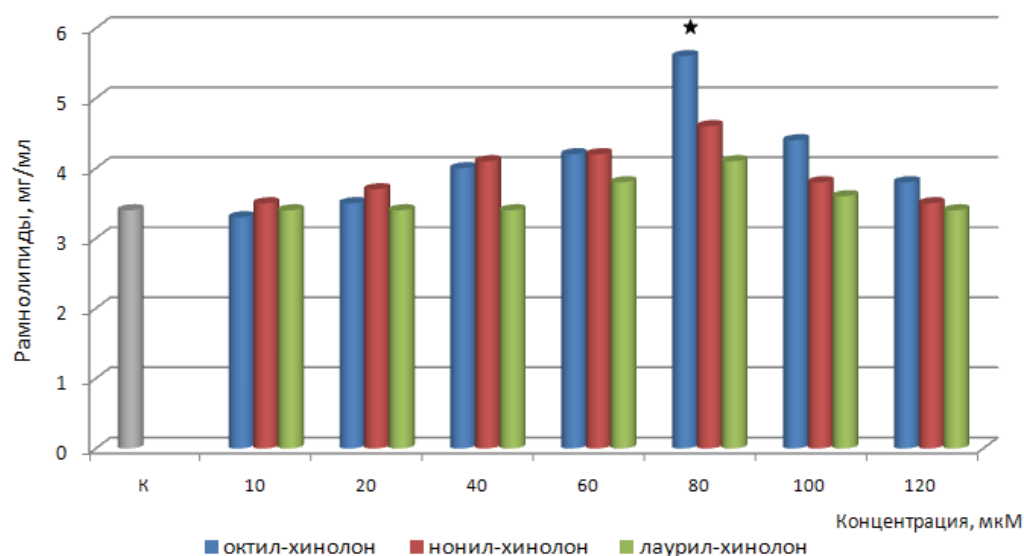


Рис. 2. Синтез рамнолипидов в системе планктон—биоплёнка в присутствии синтетических аналогов PQS

Примечание: ★ — различия достоверны по сравнению с контролем

Fig. 2. Rhamnolipids biosynthesis in plankton-biofilm system in presence of PQS synthetic analogs

Note: ★ — the differences were significant in comparison with control

Таким образом, проведенное исследование показало, что сигнальный хинолон *P. aeruginosa* в системе планктон—биоплёнка существенно увеличивает синтез рамнолипидов, который обеспечивается *rhl*-звеном системы межклеточной коммуникации. Полученные результаты подтверждают важную роль *pqs*-звена в активации процессов, контролируемых *rhl*-звеном. Ранее было показано, что экзогенный PQS увеличивает продукцию пиоцианина штаммом *P. aeruginosa* PA01 [6,10] и восстанавливает синтез этого пигмента в присутствии ингибиторов quorum sensing [1]. Кроме того, *pqs*-мутанты, имеющие полноценное *rhl*-звено, не образуют рамнолипиды, синтез которых восстанавливается после внесения в среду сигнального хинолона [10].



Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, А.С. Семенець, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ І СИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 ЗА ПРИСУТНОСТІ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ ТА ЙОГО СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ

Реферат

Мета. Дослідження синтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* за впливу екзогенного сигнального хінолону (PQS) та його синтетичних аналогів з різним числом атомів вуглецю в ацильному заміснику. **Методи.** Клітини *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 інкубували 24 години у 48-лункових планшетах «Nuclon» у присутності 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS), або його синтетичних аналогів (2-октил-, 2-нонил- або 2-лаурил-3-гідрокси-4-хінолону). Кінцеві концентрації сполук становили від 10 до 120 мкМ. Вміст рамноліпідів визначали за реакцією з орциновим реактивом. **Результати.** Встановлено, що екзогенний PQS за концентрацій 40, 60 і 80 мкМ викликає зростання рівня рамноліпідів у 1,9; 3,3 і 5,2 рази, відповідно. Підвищення концентрації сигнального хінолону до 100 і 120 мкМ зменшує його стимулюючу дію на 26% та 50% у порівнянні з рівнем, що був зареєстрований при 80 мкМ PQS. За цієї концентрації кількість планктонних клітин зростає у 3,4 разу, а маса біоплівки вдвічі. Активність синтетичних аналогів залежить від числа атомів вуглецю в ацильному ланцюгу: октил-хінолон (C_8) > нонил-хінолон (C_9) > лаурил-хінолон (C_{11}). Найбільше підвищення рівня біосурфактантів відмічено за присутності 80 мкМ октил-хінолону — на 65%. Два інших аналога підвищують його на 35% і 20%. **Висновки.** Оптимальна концентрація сигнального хінолону (PQS), що максимально підвищує синтез рамноліпідів, дорівнює 80 мкМ. Досліджені синтетичні аналоги PQS поступаються йому в здатності активувати синтез біосурфактантів *P. aeruginosa*.

Ключові слова: рамноліпіди, PQS, синтетичні аналоги PQS, *Pseudomonas aeruginosa*.



Muchlis Abedalabas, M.B. Galkin, A.S. Semenets, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

BIOFILM FORMATION AND RHAMNOLIPIDES BIOSYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 IN PRESENCE OF SIGNALING QUINOLONE AND ITS SYNTHETIC ANALOGS

Summary

Aim. Discovering of the rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* in presence of exogenic concentrations of Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) and its synthetic analogs with different amount of carbon atoms in acyl chain. **Methods.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 cells were incubated for 24 hours in 48-wells plates «Nuclon» in presence of the 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS), or its synthetic analogs (2-octyl-, 2-nonyl- or 2-lauryl-3-hydroxy-4-quinolon). Final concentrations of the discovered substances were from 10 to 120 μM . Rhamnolipids concentrations were determined with the orcinic test. **Results.** It was shown that PQS in concentration 40, 60 и 80 μM causes increase of rhamnolipides level in 1.9; 3.3 and 5.2 times, respectively. Increasing of the PQS concentration to 100 и 120 μM decrease its stimulation effect to 26% and 50% in compare with the level, it was determined with treatment of *P. aeruginosa* culture with 80 μM of PQS. When this concentration was used, planctonic cells numbers increase in 3.4 times, and biofilm mass – twice. Synthetic analogs activity depended on carbon atoms numbers in the acyl chain: octyl-quinolone (C_8) > nonyl-quinolone (C_9) > lauryl-quinolone (C_{11}). The highest level of the biosurfactant stimulation was determined in presence of the 80 μM of the octyl-PQS – up to 65%. Two other analogs increase its level in 35% and 20%. **Conclusions.** Signaling quinolone (PQS) optimal concentration, that increases rhamnolipids biosynthesis in maximum level was 80 μM . Studied synthetic PQS analogs showed the lowest ability to increase biosurfactants biosynthesis in *P. aeruginosa* compare with PQS.

Key words: rhamnolipids, PQS, PQS synthetic analogs, *Pseudomonas aeruginosa*.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкін М.Б., Іваниця В.О. Синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* за впливу вісмуткових металокомплексів порфіринів та аутоіндукторів системи *quorum sensing* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2013. — № 1. — С. 29–36.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабиц П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Abalos A., Pinazo A., Infante M., Casals M., Garcna F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // Langmuir. — 2001. — V. 17. — P. 1367–1371.
4. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86. — P. 1323–1336.
5. Banat I., Franzetti A., Gandolji I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2010. — V. 87. — P. 427–444.
6. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra Siri Ram, Worrall K.E, Cбmara M., Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR // Molecular Microbiology. — 2003. — V. 50, № 1. — P. 29–43.
7. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. environ. microbiol. — 1984. — V. 48. — № 2. — P. 301–305.
8. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044 // Biotech. Bioeng. — 2003. — V. 81, № 3. — P. 316–322.
9. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. bacteriol — 1991. — V. 173. — № 13. — P. 4212–4219.
10. Mьller M.M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production // Applied. Microbiology and Biotechnology. — 2011. — V. 91, № 2. — P. 251–264.
11. Nguyen T.T., Youssef N.H., McInerney M.J., Sabatini D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation // Water Research. — 2008. — V. 42. — P. 1735–1743.



12. *Ochsner U.A., Reiser J.* Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. — V. 92. — P. 6424–6428.

13. *Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H.* Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes // J. bacteriol. — 1997. — V. 179. — P. 5756–5767.

14. *Piljac G., Piljac V.* Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid // USA Patent № 5455232, 3 Oct. 1995.

15. *Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // J. microbiol. methods. — 2000. — V. 40, № 2. — P. 175–179.

16. *Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F., Dorey S.* Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes // Int. J. Molecular Sci. — 2010. — V. 11. — P. 5095–5108.

17. *Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J., Liang X.L., Shuler P.J., Goddard W.A., Tang Y.C.* Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery // Biotech. Bioeng. — 2007. — V. 98. — P. 842–853.

Стаття надійшла до редакції 07.05.2013 р.

