

Н.С. Водзінська, О.В. Кондратюк, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

ВПЛИВ ВІСМУТОВОГО ТА ОЛОВ'ЯНОГО КОМПЛЕКСІВ ХІНОЛІНІЛПОРФІРИНУ НА АКТИВНІСТЬ ФАГІВ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Досліджено вплив вісмутового та олов'яного комплексів хінолінілпорфірину на активність лактофагів E3, E5 і E17 та фагову інфекцію у L. lactis. Результати досліджень показали, що присутність вісмутового комплексу хінолінілпорфірину у поживному середовищі у концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ повністю зупиняє розвиток фагової інфекції. Визначення прямої дії цього порфірину на лактофаги показало, що зниження інфекційності фагів під впливом цієї сполуки досягає 64%. Антифагова активність олов'яного комплексу складає 21–29%. Обидві сполуки не мають значного впливу на адсорбцію лактофагів на бактеріальній клітині. Інгібування процесу адсорбції фагів досліджуваними порфіринами не перевищує 36%.

Ключові слова: лактофаги, антифагова активність, хінолінілпорфірини.

Фаги молочнокислих бактерій викликають постійний інтерес, передусім, через економічні втрати, які несуть підприємства молочної промисловості внаслідок фагової інфекції. Оскільки у виробництві ферментованих молочних продуктів найчастіше використовують молочнокислі бактерії роду *Lactococcus*, саме лактококові фаги найбільш розповсюдженні на молочних комбінатах та є причиною більшості неефективних технологічних процесів [7]. Лактофаги викликають загибель заквасочних мікроорганізмів, що призводить до уповільнення виробництва продукції, погіршення її якості. Порушення процесів кисломолочного бродіння може призвести не тільки до зниження якості та втрат сировини, але й до виникнення харчових отруень, адже у нормі заквасочна мікробіота інгібує умовно-патогенні мікроорганізми, присутні у молоці [1, 3]. На сьогодні існують різні підходи, завдяки яким можна зменшити ризик фагової інфекції: ротація стартерних культур, використання генетичних методів для збільшення фагорезистентності стартерних культур, пряма інокуляція стартерів у закриті ферментери та використання середовищ з антифаговими властивостями для зберігання і розмноження стартерних культур [7].



Порфірини вважаються одними з перспективних сполук для лікування інфекційних хвороб, та широко використовуються у протираковій фотодинамічній терапії. Терапія основана на використанні фотосенсибілізаторів, які після активування світлом можуть викликати різні порушення структури клітин. На сьогоднішній день показано, що порфірини проявляють антимікробні властивості щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій не лише при фотоактивації, а й у темнових умовах [4]. Ці сполуки виявляють також антивірусний ефект. Використовувати порфірини як антивірусні агенти запропоновано, перш за все, для стерилізації крові та її компонентів [11]. Останнім часом показана можливість інгібування цими сполуками фітовірусної інфекції *in vitro* та *in vivo* [5, 6]. У деяких випадках для вивчення механізмів їх дії як моделей вірусів були використані бактеріофаги [2, 12].

Метою цієї роботи було перевірити здатність нових синтетичних порфіринів пригнічувати інфекційність лактофагів.

Матеріали та методи

Штам бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 та лактофаги E3, E5 і E17 були отримані з колекції Білоруського державного технологічного університету. Культивування бактерій проводили на середовищі M17 з додаванням 0,5% глюкози.

У роботі вивчалася антифагова активність вісмутового та олов'яного комплексів хінолінілпорфіринів (Bi(III)-ТХП та Sn(IV)-ТХП), синтезованих у лабораторії синтезу нових лікарських засобів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

При вивченні прямої дії порфіринів на бактеріофаги їх інкубували разом протягом 24 годин. Після цього бактеріофаги титрували за стандартним методом подвійних агарових шарів [12]. Антифагову активність виражали у відсотках та обчислювали за формулою:

$$A = (1 - N_o/N_k) \cdot 100\%,$$

де N_o , N_k — кількість негативних колоній у досліді та контролі, відповідно.

Для того, щоб перевірити вплив порфіринів на розвиток фагової інфекції, суспензію бактерій та бактеріофагів одночасно додавали до поживного середовища, яке містило порфірини. Кінцеві концентрації *L. lactis* та фагів становили $1 \cdot 10^3$ кл/мл та $5 \cdot 10^4$ БУО/мл, відповідно. Для спостереження за перебігом нормальної інфекції бактеріальну культуру та фаги додавали в тих же концентраціях до середовища, що не містило порфірини. Контролем слугували пробірки з поживним середовищем, до якого додавали тільки бактеріальну культуру. Після 24 годин інкубації вимірювали оптичну густину середовища та порівнювали інтенсивність росту бактерії в досліді та контролі.

З метою вивчення впливу порфіринів на адсорбцію лактофагів до поживного середовища, що містило різні концентрації порфіринів, додавали бактеріальну культуру і бактеріофаг та інкубували 10 хв при



30 °С. Контрольні пробірки містили середовище без порфіринів. Після закінчення часу інкубації для зупинки процесу адсорбції фага 50 мкл суміші додавали до 4,5 мл охолодженого фізіологічного розчину, після чого піддавали низькошвидкісному центрифугуванню (5000 об/хв) протягом 5 хв. Фаги в надосаді титрували за методом подвійних агарових шарів. Ступінь адсорбції визначали у відсотках адсорбованих фагів у досліді відносно контролю за формулою:

$$A = (1 - T_3/T_n) \cdot 100 \%,$$

де T_3 – залишковий титр фага, T_n – початковий титр фага [9].

Результати та їх обговорення

На початку досліджень з'ясували вплив порфіринів на саму культуру *L. lactis* та визначили концентрації сполук, що не пригнічують ріст бактерій. Такими концентраціями для вісмутового комплексу хінолінілпорфірину виявилися 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ, а для олов'яного комплексу хінолінілпорфірину – 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ.

Таблиця

Накопичення біомаси *L. lactis subsp. lactis* 502 у присутності лактофагів та порфіринів ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$)

Table

***L. lactis subsp. lactis* 502 biomass in presence of lactophages and porphyrins ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$)**

Концентрація хінолінілпорфірину, мкМ		Лактофаг		
		Е3	Е5	Е17
Bi(III)-ТХП	0,1	1397 ± 187	431 ± 92	324 ± 49
	1	1567 ± 217	870 ± 145	756 ± 113
	10	2405 ± 81*	2170 ± 72*	2323 ± 48*
	20	2420 ± 55*	2325 ± 72*	2453 ± 53*
	40	2540 ± 102*	2418 ± 92*	2498 ± 40*
Sn(IV)-ТХП	0,1	940 ± 189	351 ± 25	297 ± 39
	1	1070 ± 206	549 ± 135	676 ± 169
	10	1530 ± 160*	1166 ± 171*	1299 ± 197*
	20	1047 ± 101*	1129 ± 240*	1000 ± 135*
К+		418 ± 55	370 ± 28	313 ± 26
К-		2380 ± 76	1998 ± 64	2381 ± 49

Примітка: К⁺ – бактерія + фаг у середовищі без порфіринів, К⁻ – бактерія у середовищі без порфіринів та фагів, * – різниця достовірна у порівнянні з контролем
 Note: К⁺ – bacterium + phage in medium without porphyrins, К⁻ – bacterium in medium without porphyrins and phages, * – significant different from the control



Дослідження впливу порфіринів на розвиток лактофагової інфекції у рідкому середовищі показало, що обидві сполуки здатні у тому чи іншому ступені стримувати або зовсім перешкоджати лізису бактеріальної культури.

Накопичення біомаси лактококу у присутності лактофагів не перевищувало 20% від контролю (табл.). Присутність у середовищі досліджуваних сполук у концентрації 0,1 мкМ майже ніяк не змінювала цей показник, тоді як накопичення біомаси бактерії при концентрації 1 мкМ було у 2–3 рази вищим, ніж у контролі з фагом. Найбільш ефективною сполукою виявився вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину, присутність якого у середовищі у концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ повністю зупиняла розвиток фагової інфекції. У присутності 10 та 20 мкМ олов'яного комплексу хінолінілпорфірину концентрація бактерій була у 3–4 рази вищою ніж у контролі з фагом.

Визначення прямої дії порфіринів на лактофаги показало, що більш активним є вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину. Так, присутність цієї сполуки у концентрації 10 мкМ зменшує літичну активність лактофагів на 33–42%, у концентрації 20 мкМ — на 42–61% та 40 мкМ — на 56–64%. Інші концентрації цього порфірину пригнічували інфекційність фагів на 14–24% (рис. 1).

Антифагова активність олов'яного комплексу в усіх досліджуваних концентраціях була майже на одному рівні та складала 21–29%.

Зважаючи на отримані дані, що свідчать про наявність у досліджуваних сполук антивірусного ефекту, було доцільно перевірити здатність даних речовин впливати на початкові стадії інфекції, а саме — на процес адсорбції. Ефект інгібування цього процесу сполуками може вказувати на блокування певних структурних ділянок фага, що відповідають за адсорбцію.

Результати дослідження показали, що олов'яний комплекс хінолінілпорфірину не інгібував процес адсорбції фага E3 на *L. lactis*, але гальмував цей процес у фага E5 на 9–33%, а у фага E17 — на 5–13% (рис. 2).

Вісмутовий комплекс знижував відсоток адсорбції фага E5 на 33% у найбільшій концентрації та на 9–17% у інших концентраціях.

Для фагів E3 та E17 ефективною виявилася тільки концентрація цієї сполуки у 40 мкМ, яка затримувала процес адсорбції на 14% та 36%, відповідно (рис. 2).

Отже, результати досліджень показали, що досліджувані сполуки не мають значного впливу на процес адсорбції лактофагів. Можливо, додатковою мішенню дії порфіринів виступає ДНК бактеріофага. Дослідження McMillin *et al.* свідчать про те, що порфірини можуть зв'язуватися ззовні або інтеркалювати у ДНК у залежності від природи ДНК субстрату [10].



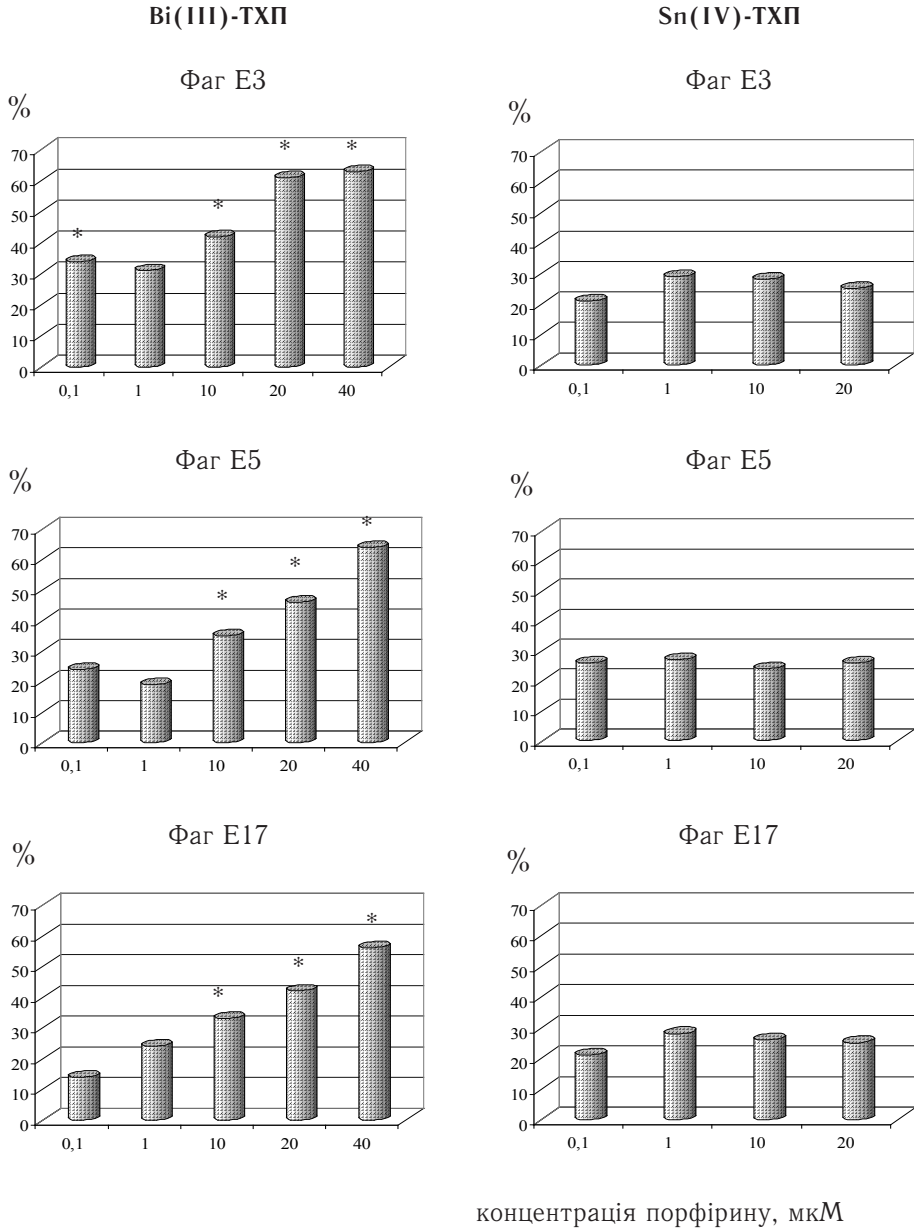


Рис. 1. Антифагова активність досліджуваних хінолінілпорфіринів щодо фажів *L. lactis*

Примітка: вісь ординат – антифагова активність сполук, %;
* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. The antiphage activity of studied quinolinilporphyrins in *L. lactis*

Note: y-axis – antiphage activity of compound, %;
* – significant different from the control



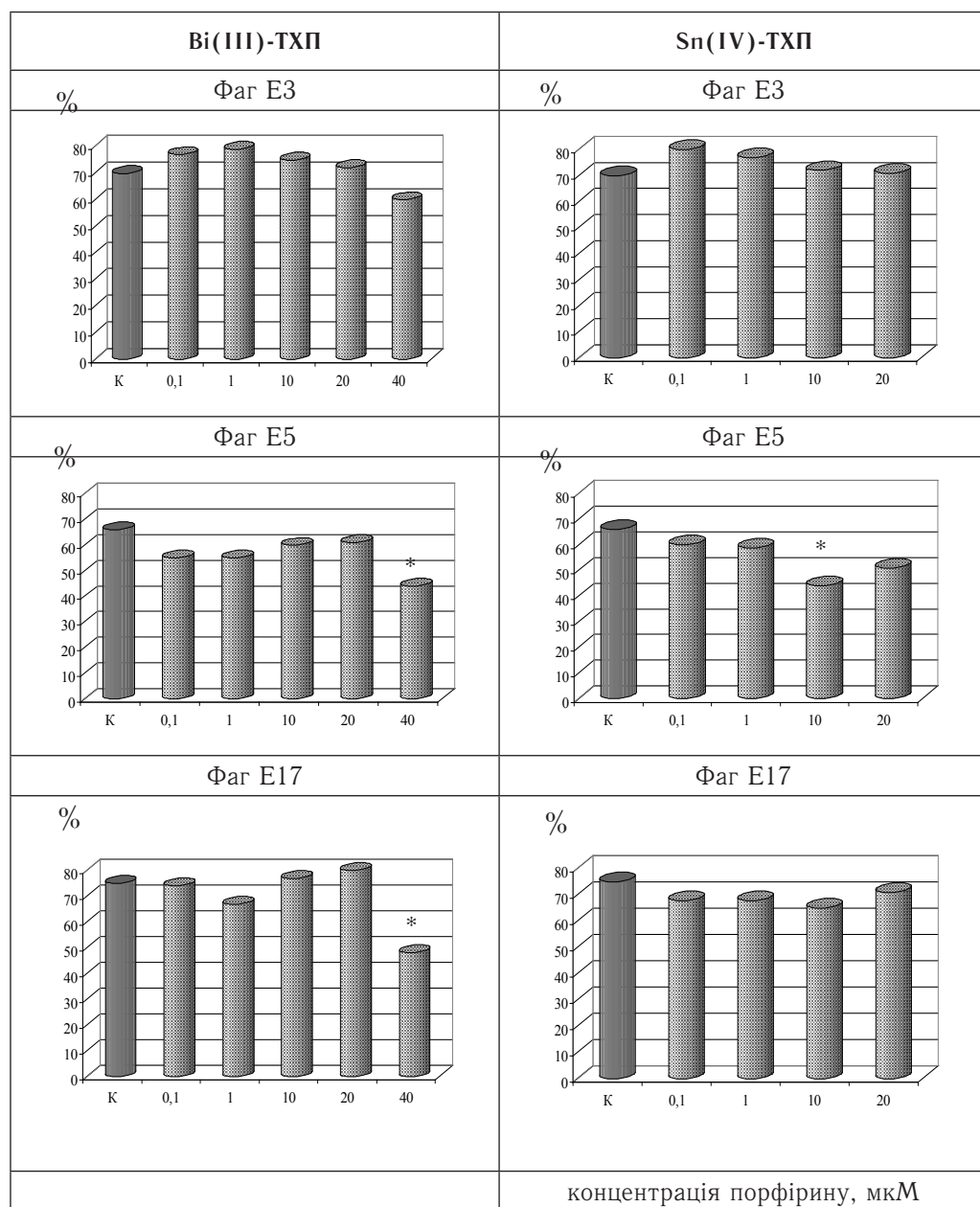


Рис. 2. Адсорбція лактофагів на клітинах *L. lactis* у присутності досліджуваних хінолінілпорфіринів

Примітка: вісь ординат – відсоток адсорбованих бактеріофагів;
* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Lactophage adsorption on the *L. lactis* cells in presence of studied porphyrin

Note: y-axis – percent of adsorbed bacteriophage;
* – significant different from the control



Вивчення конкурентного зв'язування цих сполук із ДНК показало, що не послідовність, а композиційний склад азотистих основ визначає характер зв'язування. Інші вчені доводять, що характер взаємодії залежить від типу центрального атому й варіює від інтеркалятивного зв'язування до агрегації на поверхні ДНК [8]. Вивчення характеру взаємодії катіонних порфіринів з ізольованою та внутрікапсидною ДНК бактеріофага T7 показали, що присутність білкового капсиду не виключає взаємодію між порфіринами та внутрішньофаговою ДНК [13].

Таким чином, після проведення подальших досліджень та остаточного з'ясування механізму дії вісмутувий комплекс хінолінілпорфірину можна рекомендувати для використання як компонент поживного середовища для стартерних культур лактококів, що запобігає розвитку фагової інфекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Борисова Г.В., Рыбакова Н.А. Предупреждение развития бактериофагов в заквасках как фактор повышения качества кисломолочных продуктов // Материалы научно-практической конференции «Научные и практические аспекты совершенствования традиционных и разработки новых технологий молочных продуктов». — Вологда, 2001. — С. 138—139.

2. Водзінська Н.С., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Ішков Ю.В., Кіриченко А.М. Інактивація стафілококового бактеріофага у присутності синтетичних порфіринів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 3. — С. 82—88.

3. Волкова И.Р., Цыганова Е.С., Ганина В.И. Аспекты получения биологически безопасных ферментированных молочных продуктов // Материалы IV Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Живые системы и биологическая безопасность населения». — М: МГУПБ, 2005. — С. 111—113.

4. Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Іваниця В.О., Жиліна З.І., Водзінський С.В., Водзінська Н.С. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 10, № 7, біологія. — С. 110—116.

5. Крулько І.В., Заїка С.А., Харіна А.В., Водзінська Н.С., Поліщук В.П. Порфірини як інгібітори розвитку вірусної інфекції в культурі рослинних тканин // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — № 2. — С. 47—52.

6. Крулько І.В., Харіна А.В., Водзінська Н.С., Філіпова Т.О., Поліщук В.П. Антифiтовірусна активність синтетичних порфіринів у системі *in vivo* // Агроєкологічний журнал. — 2008. — Спец. випуск. — С. 138—139.

7. Перфильев Г.Д., Кувалдина Н.Ф. Бактериофаги и их роль в сыроделии. Методы предотвращения фаголизиса заквасочной микрофлоры



// Научно-практический семинар «Бактериальные закваски и концентраты в производстве ферментированных молочных продуктов». — Углич, 2000. — С. 37–48.

8. *Li J., Wei Y., Guo L., Zhang C., Jiao Y., Shuang S. and Dong C.* Study on spectroscopic characterization of Cu porphyrin/Co porphyrin and their interactions with ctDNA // *Talanta*. — 2008. — V. 76. — P. 34–39.

9. *Lucey M., Daly C., Fitzgerald G.* Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption // *Journal of General Microbiology*. — 1992. — V. 138. — P. 2137–2143.

10. *McMillin D.R., Shelton A.H., Bejune S.A., Fanwick P.E. and Wall R.K.* Understanding binding interactions of cationic porphyrins with B-form DNA // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2005. — V. 249. — P. 1451–1459.

11. *North J., Neyndorff H., Levy J.G.* Photosensitizers as virucidal agents // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1993. — V. 17. — P. 99–108.

12. *Ramezani M., Behravan J., Arab M., Farzad S.A.* Antiviral activity of *Euphorbia helioscopia* extract // *Journal of Biological Sciences*. — 2008. — V. 8. — P. 809–813.

13. *Zupan K., Herenyi L., Toth K., Majer Z., Csik G.* Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods // *Biochemistry*. — 2004. — V. 43. — P. 9151–9159.

УДК 578.282

Н.С. Водзинская, А.В. Кондратюк, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ВИСМУТОВОГО И ОЛОВЯННОГО КОМПЛЕКСОВ ХИНОЛИНИЛПОРФИРИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОВ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Реферат

Исследовано влияние висмутового и оловянного комплексов хинолинилпорфиринов на активность лактофагов E3, E5 и E17 и фаговую инфекцию у *L. lactis*. Результаты исследований показали, что наличие ви-



смутового комплексу хинолинилпорфирина в питательной среде в концентрациях 10 мкМ, 20 мкМ и 40 мкМ полностью останавливает развитие фаговой инфекции. Определение прямого действия этого порфирина на лактофаги показало, что снижение инфекционности фагов под действием данного соединения достигает 64%. Антифаговая активность оловянного комплекса составляет 21–29%. Оба порфирина не оказывают значительного влияния на адсорбцию лактофагов на бактериальной клетке. Ингибирование процесса адсорбции фагов исследуемыми соединениями не превышает 36%.

Ключевые слова: лактофаги, антифаговая активность, хинолинилпорфирины.

UDC 578.282

N.S. Vodzinska, O.V. Kondratyuk, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

INFLUENCE OF QUINOLINILPORPHYRIN BISMUT AND TIN COMPLEXES ON *LACTOCOCCUS LACTIS* PHAGES ACTIVITY

Summary

Influence of quinolinilporphyrin bismuth and tin complexes on lactophages E3, E5 and E17 activity and phage infection process in *L. lactis* has been studied. The results of investigation show that bismuth quinolinilporphyrin complex presence in the nutrient medium at 10 μM , 20 μM and 40 μM concentrations completely inhibits phage infection process. Determination of direct influence of this compound on the lactophage shows that reduction of phage activity reaches up 64%. Antiphage activity of tin complex is equal to 21–29%. Both compounds have no significant influence on the lactophage adsorption process. Inhibition of phage adsorption by the compounds does not exceed 36%.

Key words: lactophages, antiphage activity, quinolinilporphyrins.

