



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/48 (2019.05); G01N 33/52 (2019.05); G01N 2333/21 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018137121, 22.10.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
22.10.2018Дата регистрации:  
24.10.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.10.2018

(45) Опубликовано: 24.10.2019 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, раб. пос. Краснообск, а/я 463, ИЭВСиДВ СФНЦА РАН

(72) Автор(ы):

Афонюшкин Василий Николаевич (RU),  
Донченко Николай Александрович (RU),  
Фоменко Владислав Викторович (RU),  
Филипенко Максим Леонидович (RU),  
Коптев Вячеслав Юрьевич (RU),  
Давыдова Наталья Владимировна (RU),  
Козлова Юлия Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ГРИЦЕНКО В.А. и др.

Антагонистические взаимоотношения *Pseudomonas aeruginosa* с грамотрицательными бактериями // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). - 2016. - N.4. - 11с. RU 2670585 C1, 23.10.2018. RU 2187801 C2, 20.08.2002. RU 2376381 C2, 20.12.2009. RU 2328734 C1, 10.07.2008.(54) Способ определения антагонистической активности штаммов бактерий в отношении *Pseudomonas aeruginosa*

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу определения антагонистической активности штаммов бактерий в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, включающему культивирование *Pseudomonas aeruginosa* и тестируемых штаммов на питательных средах, отличающемся тем, что выявление антагонистической активности тестируемых штаммов осуществляют путем оценки продукции оксифеназинов *P. aeruginosa* в присутствии тестируемых штаммов в сравнении

с чистой культурой *P. aeruginosa* на основе спектрофотометрической оценки их содержания в экстрактах, и при установлении факта подавления продукции оксифеназинов выявляют антагонистическую активность тестируемого штамма. Использование способа позволяет оценивать антагонистическую активность штаммов бактерий, подавляющих рост *P. aeruginosa* и препятствующих накоплению факторов патогенности, ассоциируемых с образованием биопленок. 4 пр., 2 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/48* (2006.01)  
*G01N 33/52* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/48 (2019.05); G01N 33/52 (2019.05); G01N 2333/21 (2019.05)*(21)(22) Application: **2018137121, 22.10.2018**(24) Effective date for property rights:  
**22.10.2018**Registration date:  
**24.10.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **22.10.2018**(45) Date of publication: **24.10.2019 Bull. № 30**

Mail address:

**630501, Novosibirskaya obl., Novosibirskij r-n, rab.  
pos. Krasnoobsk, a/ya 463, IEVSiDV SFNTSA  
RAN**

(72) Inventor(s):

**Afonyushkin Vasilij Nikolaevich (RU),  
Donchenko Nikolaj Aleksandrovich (RU),  
Fomenko Vladislav Viktorovich (RU),  
Filipenko Maksim Leonidovich (RU),  
Koptev Vyacheslav Yurevich (RU),  
Davydova Natalya Vladimirovna (RU),  
Kozlova Yuliya Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
uchrezhdenie nauki Sibirskij federalnyj  
nauchnyj tsentr agrobiotekhnologij Rossijskoj  
akademii nauk (SFNTSA RAN) (RU)**(54) **METHOD OF DETERMINING ANTAGONIST ACTIVITY OF BACTERIAL STRAINS WITH RESPECT TO PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, namely to a method for determining antagonistic activity of bacterial strains with respect to *Pseudomonas aeruginosa*, including culturing *Pseudomonas aeruginosa* and tested strains on nutrient media, characterized by that the antiviral activity of the tested strains is detected by evaluating the production of oxyphenazines *P. aeruginosa* in the presence of tested strains compared to pure culture *P. aeruginosa* based

on spectrophotometric evaluation of their content in extracts, and when observing suppression of oxyphenazine production, antagonistic activity of test strain is detected.

EFFECT: use of the method enables assessing antagonist activity of growth inhibitory bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and preventing accumulation of pathogenicity factors associated with formation of biofilms.

1 cl, 4 ex, 2 tbl

Изобретение относится к области ветеринарии а именно, к способу определения антагонистической активности штаммов микроорганизмов против *Pseudomonas aeruginosa*, также способ может быть использован в микробиологии и других областях.

Интегральным критерием антагонистической активности синегнойной палочки является снижение концентрации оксифеназинов (соединений которые образует синегнойная палочка в процесс реакций чувства кворума), для накопления которых нужно наличие синегнойной палочки и продукции этим микроорганизмом токсичного метаболита - пиоцианина, относящегося к оксифеназинам.

Известен способ определения антагонистической активности в тестах по сокультивированию (патент РФ №2376381 C1 от 20.12.2009 МПК C12Q 1/00 (2006.01), включающий получение из исследуемой культуры микроорганизмов экстрактов, представляющих собой экзометаболиты, клеточный экстракт и клеточные стенки. Полученные экстракты обеззараживают хлороформом из расчета 0,1 мл хлороформа на 3 мл экстракта. Затем смешивают каждый из подготовленных препаратов со штаммом-антагонистом в соотношении 1:2 соответственно. Параллельно готовят две контрольные пробы, при этом контроль 1 готовят из жидкой питательной среды и физиологического раствора, а контроль 2 - из жидкой питательной среды и штамма-антагониста. После чего опытные и контрольные пробы инкубируют. После этого разбавляют жидкой питательной средой, инкубируют и отделяют супернатанты (надосадочную жидкость) центрифугированием. Полученные супернатанты обеззараживают путем обработки их хлороформом из расчета 0,1 мл хлороформа на 3 мл супернатанта. Обеззараженные супернатанты смешивают с взвесью индикаторного штамма в соотношении 1:2 соответственно. Инкубируют и разбавляют жидкой питательной средой. После чего высевают индикаторный штамм на плотную питательную среду и культивируют. Затем подсчитывают КОЕ (колониеобразующие единицы) в опытных и контрольных пробах. Рассчитывают антагонистическую активность штамма-антагониста и по изменению антагонистической активности в опытных пробах по сравнению с контролем судят о способности исследуемой культуры микроорганизмов регулировать антагонистическую активность бактерий. Изобретение позволяет определять способность микроорганизмов регулировать антагонистическую активность бактерий.

Недостатком данного способа является то, что способ предусматривает оценку взаимодействия только клеточных компонентов исследуемого микроорганизма (экзометаболитов, клеточного экстракта и клеточных стенок), а не живых микроорганизмов на рост штамма-антагониста.

Известен способ определения продукции оксифеназинов. Пиоцианин (оксифеназин) последовательно экстрагируют и 0,2М HCl (соляной кислотой) после чего его содержание определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм хлороформом (Essar et al., 1990 D.W. Essar, L. Eberly, A. Hadero, I.P. Crawford Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications *Journal of Bacteriology*, 172 (1990), pp. 884-900).

Недостатком данного способа является то, что способ не используется для оценки антагонистической активности бактерий в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

Наиболее близким по технической сущности и выбранным в качестве прототипа является определение антагонистической активности штаммов бактерий (патент РФ №2328734 C1 от 10.07.2008 МПК G01N 33/48 (2006.01), G01N 33/15 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01), при котором выделяют чистые культуры бактерий, после чего осуществляют

пересев культур, различающихся по морфологическим критериям и ферментативной активности, на мясопептонный агар, изучают их рост в присутствии тест-штамма *Proteus vulgaris*. Культуры, которые не были подавлены ползучим ростом подвижного штамма *P. vulgaris*, считаются антагонистичными в отношении данного вида микроорганизма.

5 Использование способа позволяет проводить массовый поиск широкого видового спектра пробиотических штаммов бактерий, обладающих антагонистической активностью в отношении *P. vulgaris*, путем тестирования больших количеств культур микроорганизмов, высеваемых из различных источников. Также, использование способа позволяет оценивать антагонистическое действие бактерий в отношении одного из механизмов патогенности *P. vulgaris*.

Недостатком данного способа является только визуальная оценка антагонистической активности исследуемых штаммов, путем подавления подвижного роста *P. vulgaris* на твердой питательной среде. В данном способе отсутствует сопоставление роста исследуемых культур без *P. vulgaris*. Данный тест не используется для оценки антагонистической активности культур в отношении *P. aeruginosa*, которая является наибольшей проблемой обуславливающей сложность терапии хронических инфекций у людей и животных особенно с признаками иммунодефицита.

Задачей заявленного изобретения является поиск штаммов бактерий, которые будут подавлять выработку оксифеназинов *P. aeruginosa*, являющихся критерием биологической активности бактерий этого вида, при формировании биопленки.

Поставленная задача решается тем, что в способе определения антагонистически активных штаммов бактерий в отношении *P. aeruginosa*, включающем культивирование тестируемых штаммов бактерий вместе с *P. aeruginosa*, согласно изобретению, выявление антагонистической активности тестируемых штаммов осуществляют путем оценки продукции оксифеназинов *P. aeruginosa* в присутствии штаммов-антагонистов в сравнении с чистой культурой *P. aeruginosa* на основе спектрофотметрической оценки их содержания в экстрактах.

Способ осуществляется следующим образом сокультивирование культуры *P. aeruginosa* с тестируемым штаммом микроорганизма в жидкой питательной среде, одновременно проводится культивирование чистой культуры *P. aeruginosa* при температуре 37°C в течение 22-24 ч., согласно изобретению, после инкубации оксифеназины экстрагируют последовательно вначале 1 мл хлороформа, а затем 1 мл 0,2М HCl, Оценка подавления синтеза оксифеназинов производится путем выявления снижения оптической плотности экстракта оксифеназинов *P. aeruginosa* (при сокультивировании) при длине волны 520 нм в сравнении с контрольной пробой (чистой культурой *P. aeruginosa*). Антагонистическая активность тестируемого штамма выявляется по факту подавления продукции оксифеназинов *P. aeruginosa*.

Для иллюстрации способа приведены примеры.

Пример 1. Способ определения оксифеназинов

40 Для выявления штаммов бактерий подавляющих продукцию оксифеназинов использовали культуру *P. aeruginosa* стабильно продуцирующей оксифеназины. Штамм засеивали в объеме 100 мл триптиказо-соевого бульона и выращивали при температуре 37°C в течение 22 ч до стационарной фазы, которая сопровождалась накоплением концентрации клеток  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл и оксифеназинов. Затем клетки из культуральной среды осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 минут. Осадок отмывали один раз физиологическим раствором, и снова повторяли осаждение клеток методом центрифугирования при тех же условиях. Отмытые клетки ресуспендировали в 10 мл триптиказо-соевого бульона, таким образом сконцентрировали клетки в 10 раз

и повысили титр *P. aeruginosa* до конечной концентрации клеток  $3,2 \times 10^{10}$  КОЕ/мл, а затем вносили по одному миллилитру в конические пробирки содержащие по 5 мл суточной культуры тестируемой бактерии *Lactobacillus* spp., в качестве отрицательного контроля при сокультивировании штаммов использовали *P. aeruginosa*. Полученные образцы сокультивирования штаммов инкубировали при температуре 37°C в течение 23 ч. Затем оксифеназины экстрагировали последовательно вначале 1 мл хлороформа, а затем 1 мл 0,2М HCl, экстрагированные образцы объединяли. После чего содержание оксифеназинов определяли спектрофотметрически на спектрофотометре СФ-ломо 26. Продукция оксифеназинов *P. aeruginosa* в тестах по сокультивированию с *Lactobacillus* spp. составляла  $OD_{520\text{нм}} 0,01 \pm 0,001$ , в отличие от контроля *P. aeruginosa*  $OD_{520\text{нм}} 0,27 \pm 0,13$ .

Таким образом, происходит полное подавление синтеза оксифеназинов лактобактериями при сокультивировании с *P. aeruginosa*.

Пример 2. Поиск штаммов подавляющих активность образования оксифеназинов *P. aeruginosa*

Для выявления штаммов бактерий подавляющих продукцию оксифеназинов использовали культуру *P. aeruginosa* стабильно продуцирующей оксифеназины. Штамм засекали в объеме 1000 мл триптиказо-соевого бульона и выращивали при температуре 37°C в течение 22 ч до стационарной фазы, которая сопровождалась накоплением

концентрации клеток  $4,5 \times 10^9$  КОЕ/мл и оксифеназинов. Затем клетки из культуральной среды осаждали центрифугированием при 5000 об./мин в течение 10 минут. Осадок отмывали один раз физиологическим раствором, и снова повторяли осаждение клеток методом центрифугирования при тех же условиях. Отмытые клетки ресуспендировали в 100 мл триптиказо-соевого бульона, таким образом сконцентрировали клетки в 10

раз и повысили титр *P. aeruginosa* до конечной концентрации клеток  $5,3 \times 10^{10}$  КОЕ/мл, а затем вносили по одному миллилитру в конические пробирки содержащие по 5 мл суточных культур тестируемых бактерий *Weissella solipiscis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Pseudomonas oryzae*, *Enterobacter oryzae*, *Serratia* spp., в качестве отрицательного контроля при сокультивировании штаммов использовали *P. aeruginosa*.

Полученные образцы сокультивирования штаммов инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Затем из каждого образца при сокультивировании экстрагировали оксифеназины последовательно, вначале 1 мл хлороформа, а затем 1 мл 0,2М HCl, экстрагированные образцы объединяли. После чего содержание оксифеназинов определяли спектрофотметрически при длине волны 520 нм используя спектрофотометр СФ-ломо 26.

Данные по активности продукции оксифеназинов *P. aeruginosa* в тестах по сокультивированию с различными бактериями представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Таксономическая принадлежность	Штамм	N	Оптическая плотность оксифеназинов при OD 520 нм		
			У.ед.	CI-95%	CI+95%
1	2	3	4	5	6
<i>Weisella solipiscis</i>	L43	3	0,011±0,001	0,009489	0,011711

1	2	3	4	5	6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Sah D 13.3	3	0,130±0,095	-0,104616	0,365283
<i>Staphylococcus cohnii</i>	H 21.2	3	0,107±0,055	-0,030149	0,243482
<i>Pseudomonas oryzae</i>	Sah D 16.3	3	0,103±0,068	-0,065758	0,272425
<i>Enterobacter oryza</i>	Sah D 17.2	3	0,105±0,0638	-0,053577	0,263577
<i>Serratia spp.</i>	B 10.2	3	0,2046±0,138	-0,139471	0,546805
<i>P.aeruginosa</i>	P	3	0,269±0,132	-0,060004	0,597337

Для оценки ингибирования продукции оксифеназинов *P. aeruginosa* рассчитывали удельную долю оптической плотности экстракта оксифеназинов, образовавшихся в присутствии тестируемого штамма, от оптической плотности экстракта чистой культуры *P. aeruginosa*. Например, штамм *Weisella solipiscis* L43 подавлял продукцию оксифеназинов *P. aeruginosa* на 95,91% что позволяет его рассматривать в качестве перспективного пробиотического штамма.

Пример 3. Снижение синтеза бутаноил-гомосеринлактона

Для разрушения бутаноил-гомосеринлактона (сигнальной молекулы запускающей ряд реакций чувства кворума) проводили сокультивирование *P. aeruginosa* и *Enterobacter cloacae* SahD11-2 подавляющего синтез оксифеназинов. Штамм *E. cloacae* SahD11-2 в предварительных экспериментах подавлял образование оксифеназинов *P. aeruginosa* ( $OD_{520 \text{ нм}} 0,12 \pm 0,05$ ). Предварительно выращивали по 10 мл культуры *P. aeruginosa* в течение 5 суток при комнатной температуре, затем культуры центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин, осадок ресуспендировали в 1 мл стерильного физиологического раствора. В пробирки с культурой *Enterobacter cloacae* SahD11-2

вносили по 1 мл отмытой и ресуспендированной в физиологическом растворе биомассу *P. aeruginosa*. После сокультивирования при 37°C в течение суток, культуры центрифугировали 5000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант стерилизовали добавлением 200 мкл хлороформа. Бутаноил-гомосеринлактон из образцов экстрагировали 1% раствором уксусной кислоты в ацетонитриле трехкратно. Объединенные экстракты высушивали в вакууме, растворяли в 150 мкл ледяной уксусной кислоте. Хромато-масспектрометрические исследования выполняли с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 (с диодно-матричным детектором) и гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра micrOTOF-Q (фирма Bruker). Для хроматографирования использовали колонку в Zorbax Bonus-RP (2.1\*100 mm, 3.5 μm) и Zorbax Eclipse XDB-C8 (2.1\*150 mm, 3.5 μm) с линейным градиентом от 10 до 100% АСН с 3-й до 33-й минуты. Скорость потока: 0,2 мл/мин 0.2 ml/min, 5 μL пробы. УФ-детектирование вели на 250/320 нм.

Рабочие параметры масс-детектирования. Метод ионизации: электростатическое распыление при атмосферном давлении (API-ES). Детектирование положительных ионов в диапазоне  $m/z=80-1300$ . Поток газа-осушителя (азот): 8 л/мин, его температура: 230°C, давление на распылителе: 3 bar.

Для исследований использовали штаммы *P. aeruginosa* стабильно секретирующие в стационарной фазе бутаноил-гомосеринлактон (что было установлено на основании LC-ESI-Q-TOF-MS). Проведенная хроматография и масспектрометрический анализ показал снижение продукции бутанол-гомосеринлактона.

Таким образом, штамм *Enterobacter cloacae* SahD11-2 характеризовался как способностью к подавлению синтеза оксифеназинов *P. aeruginosa*, так и способностью к подавлению сигнала соответствующего бутаноил-гомосеринлактону при HPLC/MS анализе. Это свидетельствует о том, что предлагаемый способ позволяет оценивать не только подавление роста *P. aeruginosa*, но и подавление продукции такого фактора патогенности как бутаноил-гомосеринлактон, который является сигнальной молекулой, и отвечает за интенсивность реакций кворум-сенсинга (чувства кворума) в биопленках.

Предложенный способ следует считать удобным тестом для интегральной оценки антагонистической активности микроорганизмов в отношении *P. aeruginosa* так как в тестах по сокультивированию может быть затруднительным разделение бактерий разных видов при подсчете числа КОЕ.

Пример 4. Применение предлагаемого способа для поиска антагонистически активных штаммов.

Для поиска антагонистически активных штаммов было взято 26 штаммов бактерий преимущественно рода *Bacillus*. Культуры бацилл выращивали при комнатной температуре на среде LB 3 суток. Затем к 5 мл среды добавляли 1 мл культуры (тщательно ресуспендированной) и 100 мкл суточной культуры *P. aeruginosa* штамм 669 ИХБФМ и культивировали при 37C 24 ч. Также выращивали чистую культуру *P. aeruginosa* в аналогичных условиях. Оценивали продукцию оксифеназинов визуально и по предлагаемому способу. Тесты проводили в трех повторностях. Результаты опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2.

№№ в коллекции бацилл ИХБФМ ГФ	Вид/ штамм	Рост СГП	1	2	3	Положительный контроль
1	2	3	4	5	6	7
6	<i>B. subtilis</i>	-	0,005	0,000	0,000	0,095
8	<i>B. atrophaeus</i>	-	0,005	0,005	0,000	0,095
9	<i>B. mucoides</i>	-	0,005	0,000	0,005	0,095
12	<i>B. coagulans</i> ИХБФМ	+	0,015	0,015	0,020	0,095
13	<i>Bacillus spp.</i> Cu 2	+	0,020	0,025	0,020	0,095
14	<i>B. thuringiensis</i>	-	0,005	0,000	0,005	0,095
15	<i>B. subtilis</i>	+	0,025	0,025	0,025	0,095
16	<i>B. subtilis</i>	+	0,015	0,020	0,020	0,095
17	<i>B. thuringiensis</i>	+	0,030	0,030	0,035	0,095
18	<i>B. subtilis</i>	+	0,055	0,055	0,060	0,095
19	<i>B. subtilis</i>	+	0,020	0,020	0,020	0,095
20	<i>B. thuringiensis</i>	+	0,017	0,020	0,015	0,12
21	<i>B. lentus</i>	+	0,035	0,040	0,035	0,12
22	<i>B. pumilus</i> медведь 3/10	-	0,000	0,000	0,000	0,12

1	2	3	4	5	6	7
23	<i>B. pumilus</i> медведь 3/10	-	0,005	0,005	0,005	0,12
24	<i>B. pumilus</i> медведь 7/10	-	0,005	0,005	0,000	0,12
25	<i>B. pumilus</i> медведь 7/10`	+	0,08	0,08	0,085	0,065
26	<i>B. pumilus</i> медведь k-123	-	0,005	0,000	0,005	0,065
27	<i>B. subtilis</i> 9865 ВКПМ	+	0,06	0,055	0,065	0,065
29	<i>Bacillus spp.</i> Зерно 17	+	0,025	0,030	0,020	0,065
30	<i>B. pumilus</i>	+	0,015	0,015	0,010	0,065
31	<i>B. megaterium</i>	+	0,125	0,120	0,125	0,045
32	<i>B. mucoides</i>	-	0,000	0,005	0,005	0,045
33	<i>B. simplex</i>	+	0,010	0,015	0,015	0,045
34	<i>B. cereus</i>	+	0,012	0,015	0,020	0,045
35	<i>B. cereus</i>	+	0,055	0,060	0,050	0,045

Как следует из таблицы 2, 10 штаммов микроорганизмов подавляли образование оксифеназинов *P. aeruginosa* что позволяет их отнести к антагонистически активным в отношении данного вида патогенных микроорганизмов.

(57) Формула изобретения

Способ определения антагонистической активности штаммов бактерий в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, включающий культивирование *Pseudomonas aeruginosa* и тестируемых штаммов на питательных средах, отличающийся тем, что выявление антагонистической активности тестируемых штаммов осуществляют путем оценки

продукции оксифеназинов *P. aeruginosa* в присутствии тестируемых штаммов в сравнении с чистой культурой *P. aeruginosa* на основе спектрофотометрической оценки их содержания в экстрактах, и при установлении факта подавления продукции оксифеназинов выявляют антагонистическую активность тестируемого штамма.

5

10

15

20

25

30

35

40

45