

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>
УДК 615.356:577.161.11



Оригинальная статья / Research article

Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения?

А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк, Е. В. Бурцева✉, С. Я. Османова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (КФУ имени В. И. Вернадского). 295007, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, просп. Академика Вернадского, д. 4

✉ Контактное лицо: Бурцева Елена Владимировна. E-mail: burtsevaev2009@yandex.ru

ORCID: А. М. Кацев – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>; С. Л. Сафронюк – <https://orcid.org/0000-0002-6276-7755>;
Е. В. Бурцева – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; С. Я. Османова – <https://orcid.org/0009-0005-7494-1609>.

Статья поступила: 04.10.2023

Статья принята в печать: 10.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. В настоящее время поиск новых антибактериальных веществ является актуальной задачей из-за растущей устойчивости патогенов к существующим антибиотикам. Одним из ключевых направлений в этой области является расширение научных исследований лекарственного сырья растительного происхождения в качестве новых источников терапевтических средств. В данной работе изучается возможность применения для этих целей высокочувствительных бактериальных тест-объектов, обладающих биолюминесценцией, которые позволяют быстро выявить неспецифическую антимикробную активность и могут быть адаптированы к технологиям высокопроизводительного фармацевтического скрининга.

Цель. Изучение применимости биолюминесцентных бактерий для анализа антибактериальной активности биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения.

Материалы и методы. В работе использовали биологически активные вещества кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловую кислоту и тимохинон, которые часто встречаются в лекарственном растительном сырье и с которыми связывают его антибактериальные свойства. В качестве тест-объектов использовали бактерии с конститутивной биолюминесценцией *Aliivibrio fischeri* F1 и *Escherichia coli* (pXen7), а также рекомбинантные биорепортерные штаммы с индуцибельным свечением: *E. coli* (pRecA-lux), *E. coli* (pColD-lux), реагирующие на повреждение нуклеиновых кислот; *E. coli* (pKatG-lux), *E. coli* (pSoxS-lux), чувствительные к окислительному стрессу.

Результаты и обсуждение. Установлено, что неспецифическая антимикробная активность исследуемых БАВ проявляется в ингибировании бактериальной биолюминесценции тест-штаммов с конститутивным свечением. Отмечено, что морские тест-бактерии *A. fischeri* F1 обладают значительно большей чувствительностью к действию БАВ растительного происхождения по сравнению с рекомбинантным штаммом *E. coli* (pXen7). Показано, что их ингибирующее действие начинается при концентрациях 2 мкг/мл, а бактерицидность наступает при концентрациях от 20 мкг/мл. Приводится сравнение полученных результатов с данными по МИК и МБК грамположительных и грамотрицательных патогенов. Изучение индукции биолюминесценции рекомбинантных биорепортерных штаммов показало, что антибактериальное действие исследуемых БАВ сопровождается окислительным стрессом. Также кверцетин вызывал активацию свечения *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux), что может свидетельствовать о его участии в повреждении нуклеиновых кислот. Анализ факторов индукции биорепортерных штаммов указывает на то, что выявленные механизмы антибактериальной активности не являются основными, а могут иметь второстепенный характер.

Заключение. Показано, что интенсивность свечения природных и рекомбинантных биолюминесцентных бактерий может быть показателем антибактериальной активности БАВ природного происхождения. Установлена высокая чувствительность бактерий *A. fischeri* F1 к действию таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон. Учитывая, что биолюминесцентный анализ является количественным инструментальным методом, он может быть легко адаптирован для проведения высокопроизводительного фармацевтического скрининга.

Ключевые слова: люминесцентные бактерии, биолюминесцентные биорепортеры, биологически активные вещества, лекарственное растительное сырье

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. М. Кацев, С. Л. Сафронюк и Е. В. Бурцева отвечали за общий дизайн эксперимента, обработку и интерпретацию полученных данных. Основные эксперименты с использованием *A. fischeri* F1 и *E. coli* (pXen7) были проведены А. М. Кацевым и С. Я. Османовой. Эксперименты с биорепортерными рекомбинантными бактериями были проведены С. Л. Сафронюком. Е. В. Бурцева проводила обработку данных. Литературный поиск, подготовка и корректировка рукописи выполнены всеми авторами. Научная идея принадлежит А. М. Кацеву.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

Для цитирования: Кацев А. М., Сафронюк С. Л., Бурцева Е. В., Османова С. Я. Могут ли биолюминесцентные бактерии быть использованы для поиска новых антибактериальных веществ растительного происхождения? *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):63–70. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>

© Кацев А. М., Сафронюк С. Л., Бурцева Е. В., Османова С. Я., 2023

© Katsev A. M., Safronyuk S. L., Burtseva Y. V., Osmanova S. Y., 2023

Could Bioluminescent Bacteria be Used in the Search for New Plant-derived Antibacterial Substances?

Andrei M. Katsev, Sergey L. Safronyuk, Yelena V. Burtseva✉, Selina Y. Osmanova

V. I. Vernadsky Crimean Federal University. 4, Akademika Vernadskogo ave., Republic of Crimea, Simferopol, 295007, Russia

✉ Corresponding author: Yelena V. Burtseva. E-mail: burtsevaev2009@yandex.ru

ORCID: Andrei M. Katsev – <https://orcid.org/0000-0002-7762-3818>; Sergey L. Safronyuk – <https://orcid.org/0000-0002-6276-7755>;
Yelena V. Burtseva – <https://orcid.org/0000-0002-5418-7849>; Selina Y. Osmanova – <https://orcid.org/0009-0005-7494-1609>.

Received: 04.10.2023

Revised: 10.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. Currently, the search for new antibacterial substances is an urgent task due to the growing resistance of pathogens to existing antibiotics. One of the key directions in this area is the expansion of scientific research of medicinal plants, as new sources of therapeutic agents. This article examines the possibility of using highly sensitive bioluminescent test bacteria for these purposes, which can quickly detect non-specific antimicrobial activity and can be adapted to highly effective pharmaceutical screening technologies.

Aim. To study the applicability of bioluminescent bacteria for the analysis of the antibacterial activity of biologically active substances (BAS) of plant origin.

Materials and methods. BAS quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone, which are often found in medicinal plant raw materials and with which its antibacterial properties are associated, were used in the work. Bacteria with constitutive bioluminescence *Aliivibrio fischeri* F1 and *Escherichia coli* (pXen7), as well as recombinant bioreporter strains with inducible luminescence were used as test-objects: *E. coli* (pRecA-lux), *E. coli* (pColD-lux), reacting to nucleic acid damage; *E. coli* (pKatG-lux) and *E. coli* (pSoxS-lux), sensitive to oxidative stress.

Results and discussion. It was found that the nonspecific antimicrobial activity of the studied BAS is manifested in the inhibition of bacterial bioluminescence of test-strains with constitutive glowing. It was noted that the marine test-bacteria *A. fischeri* F1 have significantly greater sensitivity to the action of BAS, compared with the recombinant strain of *E. coli* (pXen7). It has been shown that their inhibitory effect begins at concentrations of 2 mcg/ml, and bactericidal activity occurs at concentrations of more than 20 mcg/ml. The results obtained are compared with the data on MIC and MBC of gram(+) and gram(–) pathogens. The study of the induction of bioluminescence of recombinant bioreporter strains showed that the antibacterial effect of the BAS is accompanied by oxidative stress. Also, quercetin caused activation of luminescence in *E. coli* (pRecA-lux) and *E. coli* (pColD-lux), which may indicate its participation in damage to nucleic acids. Analysis of the induction factors of bioreporter strains indicates that the revealed mechanisms of antibacterial activity are not major, but may be of a secondary nature.

Conclusion. It has been shown that the intensity of the glow of natural and recombinant bioluminescent bacteria can be an indicator of the antibacterial activity of BAS of natural origin. The high sensitivity of *A. fischeri* F1 bacteria to the action of substances such as quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone has been shown. Considering that bioluminescence analysis is a quantitative instrumental method, it can be easily adapted for high-throughput pharmaceutical screening. It has been shown that the luminescence intensity of natural and recombinant bioluminescent bacteria can be an indicator of the antibacterial activity of BAS of natural origin. The high sensitivity of *A. fischeri* F1 to the action of substances such as quercetin, 8-hydroxyquinoline, gallic acid and thymoquinone has been established. Taking in an account that bioluminescent analysis is a quantitative instrumental method, it can be easily adapted for high-throughput pharmaceutical screening.

Keywords: luminescent bacteria, bioluminescent bioreporters, biologically active substances

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Andrei M. Katsev, Sergey L. Safronyuk and Yelena V. Burtseva were responsible for the overall design of the experiment, processing and interpretation of the data obtained. The main experiments using *A. fischeri* F1 and *E. coli* (pXen7) were conducted by Andrei M. Katsev and Selina Y. Osmanova. Experiments with bioreporter recombinant bacteria were conducted by Sergey L. Safronyuk. Yelena V. Burtseva conducted data processing. Literary search, preparation and correction of the manuscript were carried out by all authors. The scientific idea belongs to Andrei M. Katsev.

Funding. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Fund № 22-25-20206, <https://rscf.ru/project/22-25-20206>.

For citation: Katsev A. M., Safronyuk S. L., Burtseva Y. V., Osmanova S. Y. Could bioluminescent bacteria be used in the search for new plant-derived antibacterial substances? *Drug development & registration*. 2023;12(4):63–70. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1592>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время поиск новых антибактериальных веществ является актуальной задачей из-за растущей устойчивости патогенов к существующим антибиотикам [1]. Одним из ключевых направлений в этой области является расширение научных исследований лекарственного сырья растительного происхождения в качестве новых источников терапевтических средств. Считается, что фитопрепа-

раты обладают рядом преимуществ по сравнению с синтетическими лекарственными средствами: широким спектром терапевтического действия и безопасностью, более низким риском развития аллергических реакций, более мягким терапевтическим эффектом [2, 3]. Многие биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения, такие как дубильные вещества, терпеноиды, алкалоиды и флавоноиды, продемонстрировали антибактериальные и противовирусные эффекты в экспериментах на

животных и *in vitro*. Однако несмотря на то, что от 25 до 50 % современных фармацевтических препаратов получают из растений, на данный момент нет коммерчески успешного антибиотика, который был бы получен из растительного сырья [4].

Учитывая разнообразие патогенных микроорганизмов и их различную чувствительность к антибактериальным веществам, задача обнаружения и выделения таких веществ из растительного сырья представляется крайне сложной [4]. На наш взгляд, перспективным направлением может стать использование высокочувствительных тест-объектов, которые позволяют быстро выявить неспецифическую антимикробную активность и могут быть адаптированы к технологиям высокопроизводительного фармацевтического скрининга (high-throughput screening). Антибактериальная активность отобранных таким образом растений (вытяжек) далее может быть исследована более детально с применением стандартных или клинических патогенных штаммов микроорганизмов.

В качестве таких тест-объектов, которые обладают высокой чувствительностью и позволяют быстро выявить антибактериальную активность, в данной работе исследуются биoluminesцентные природные (морские) бактерии и ряд рекомбинантных биорепортерных штаммов на основе *E. coli*.

Цель работы: изучить применимость биoluminesцентных бактерий для анализа антибактериальной активности БАВ растительного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения антибактериального действия использовали БАВ различных классов, которые часто встречаются в лекарственном растительном сырье и с которыми связывают его антибактериальные свойства [3, 5]. Было изучено действие таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон (Sigma-Aldrich, США) (рисунок 1).

Для приготовления исходных растворов БАВ использовали такие растворители, как вода, этанол (ООО «Компонент-Реактив», Россия) и ДМСО (х. ч.,

ООО «Компонент-Реактив», Россия), которые применяются для получения вытяжек из лекарственного растительного сырья [6]. Пробы для проведения биотестирования готовили путем добавления полученных концентрированных растворов БАВ (20 мг/мл) к водным растворам NaCl (3 % для морских бактерий и 1 % для рекомбинантных штаммов) до конечных концентраций активного компонента 0,005–0,5 мг/мл. Дополнительно пробы содержали буфер 0,05 моль/л трис-HCl, pH = 7,0. Учитывая низкую растворимость кверцетина в воде, его биологическое действие изучалось в форме суспензий, которые образовывались в процессе пробоподготовки. Остальные БАВ исследовались в виде растворов, близких к истинным.

Анализ антибактериальной активности БАВ проводился биотестированием на природных и рекомбинантных биoluminesцентных тест-бактериях, обладающих способностью излучать свет в видимой области. В работе использовали морские светящиеся бактерии *Aliivibrio fischeri* F1 из коллекции культур биoluminesцентных бактерий, созданной и поддерживаемой лабораторией биохемилюминесцентных аналитических технологий (ЛБАТ) Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Бактерии были выделены из среды Черного моря и идентифицированы ранее с использованием микробиологических и биохимических методов [7].

Также в работе использовали пять рекомбинантных штаммов бактерии на основе *E. coli* MG1655 (*E. coli*), которые были сконструированы и любезно предоставлены для работы заведующим лабораторией молекулярной генетики МФТИ д.б.н. И.В. Мануховым. Для индуцибельных штаммов (биорепортеры) в качестве положительных контролей (K+), активирующих специфические промоторы и запускающих биoluminesценцию, использовали диоксидин (АО «Новосибхимформ», Россия) и перекись водорода (ОАО «Самарамедпром», Россия) в концентрациях 0,045 и 0,15 mM соответственно [8].

Биотестирование на светящихся бактериях проводилось путем измерения интенсивности биoluminesценции по методикам, описанным ранее [9], а так-

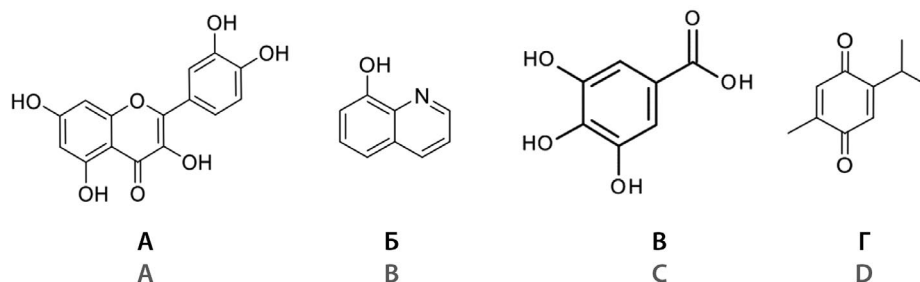


Рисунок 1. БАВ растительного происхождения, используемые в работе:

А – кверцетин; Б – 8-гидроксихинолин; В – галловая кислота; Г – тимохинон

Figure 1. Biologically active substances (BAS) of plant origin used in the work:

A – quercetin; B – 8-hydroxyquinoline; C – gallic acid; D – thymoquinone

же в соответствии со стандартом ISO11348-1:2007/Amd 1:2018¹. Анализ заключался в количественной оценке ингибирования свечения бактерий с конститутивным типом биолюминесценции [*A. fischeri* F1, *E. coli* (pXen7)] в зависимости от времени и концентрации БАВ. Результаты оценивали в виде эффективных концентраций веществ, ингибирующих биолюминесценцию на 50 % ($ЭК_{50}$).

Для оценки бактерицидного действия использовали спот-тест [10]. Тест-бактерии подвергались воздействию БАВ в течение суток при температуре 25 °C, после чего производили их высев на плотную питательную среду путем нанесения по 3 мкл каждой пробы на поверхность питательного агара (M001, HiMedia, Индия). Через сутки роста при оптимальной для каждого вида бактерий температуре на поверхности агара образовывались зоны роста, которые оценивали визуально и фотографировали на свету и в темноте для оценки роста и биолюминесценции. Снижение интенсивности или исчезновение роста и биолюминесценции оценивали как проявления бактерицидности.

Биотестирование БАВ на рекомбинантных биорепортерных штаммах проводили для выявления возможных механизмов антибактериального действия, связанных с окислительным стрессом или тропностью к нуклеиновым кислотам, по методикам, описанным ранее [11]. Результаты измерения биолюминесценции выражали в виде биолюминесцентного индекса (БИ), как отношение интенсивностей биолюминесценции в пробе (I) и контроле (I_0): $БИ = I/I_0$.

Измерение интенсивности биолюминесценции проводили с использованием биолюминометров БЛМ-8801 (СКТБ «Наука», Россия) или Lum-100 (ООО «ДИСофт», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие БАВ на морские биолюминесцентные бактерии. Такие бактерии, а именно *A. fischeri*, широко используются во всем мире в качестве биотеста для выявления био-(эко-)токсичности в отношении водных организмов [12, 13]. Детекция осуществляется инструментально, путем оценки интенсивности свечения как показателя общего метаболизма бактериальной клетки. Предприняты попытки использовать такой биотест и для выявления токсичности по отношению к высшим организмам, антимикробной активности веществ синтетического и природного происхождения, а также лекарственного растительного сырья [13, 14]. Для ряда БАВ описываются корреляции между их действием на бактериальную биолюминесценцию и токсичностью для человека

¹ Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 1: Method using freshly prepared bacteria. ISO 11348-1:2007/Amd 1:2018. Available at: <https://www.iso.org/standard/40516.html>/ Accessed: 26.10.2023.

и животных [13]. Однако применимость светящихся тест-бактерий для выявления антибактериальной активности лекарственных веществ в целом неоднозначна и является предметом исследований.

На рисунке 2 показано действие кверцетина на биолюминесценцию *A. fischeri* F1 через 30 мин воздействия. В целом кверцетин эффективно ингибировал биолюминесценцию тест-бактерии с $ЭК_{50} = 2\text{--}4$ мкг/мл и вызывал полное тушение свечения при концентрациях 5–10 мкг/мл. Спиртовые и ДМСО-растворы обладали более сильным эффектом по сравнению с водными растворами, что, очевидно, связано с лучшей растворимостью кверцетина в органических растворителях. При этом действие самих растворителей исключалось малыми объемами вносимых проб и внесением их в контрольные пробы.

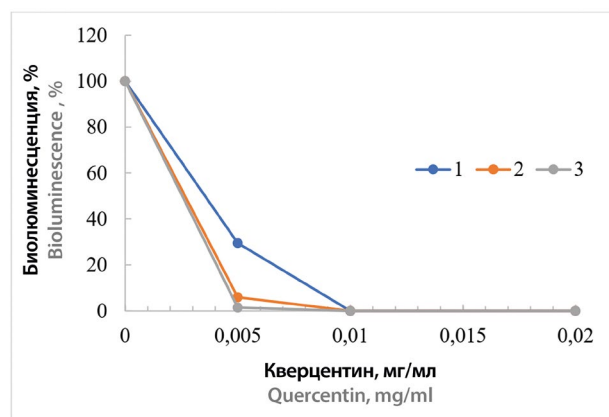


Рисунок 2. Действие кверцетина в различных растворителях на биолюминесценцию *A. fischeri* F1:

1 – вода; 2 – спирт 96%-й; 3 – ДМСО

Figure 2. The effect of quercetin in various solvents on the bioluminescence of *A. fischeri* F1:

1 – water; 2 – ethanol 96 %; 3 – DMSO

Еще одним типом биолюминесцентных тест-бактерий, которые используются при биотестировании, являются рекомбинантные бактерии с внедренными генами семейства *Lux*, кодирующими необходимые для свечения ферменты [11, 12]. Они делятся на тест-объекты с конститутивным типом биолюминесценции, которые используются аналогично природным фотобактериям, а также тест-штаммы, в которых гены *Lux* активируются специфическими промоторами. В данной работе наряду с морскими тест-бактериями *A. fischeri* F1 использовали рекомбинантный тест-штамм с конститутивной биолюминесценцией *E. coli* (pXen7). Исследования показали, что чувствительность этого тест-объекта к действию тестируемых веществ была значительно ниже, чем бактерий *A. fischeri* F1 (рисунок 3). Можно также отметить, что галловая кислота практически не оказывает влияние на биолюминесценцию *E. coli* (pXen7) при кон-

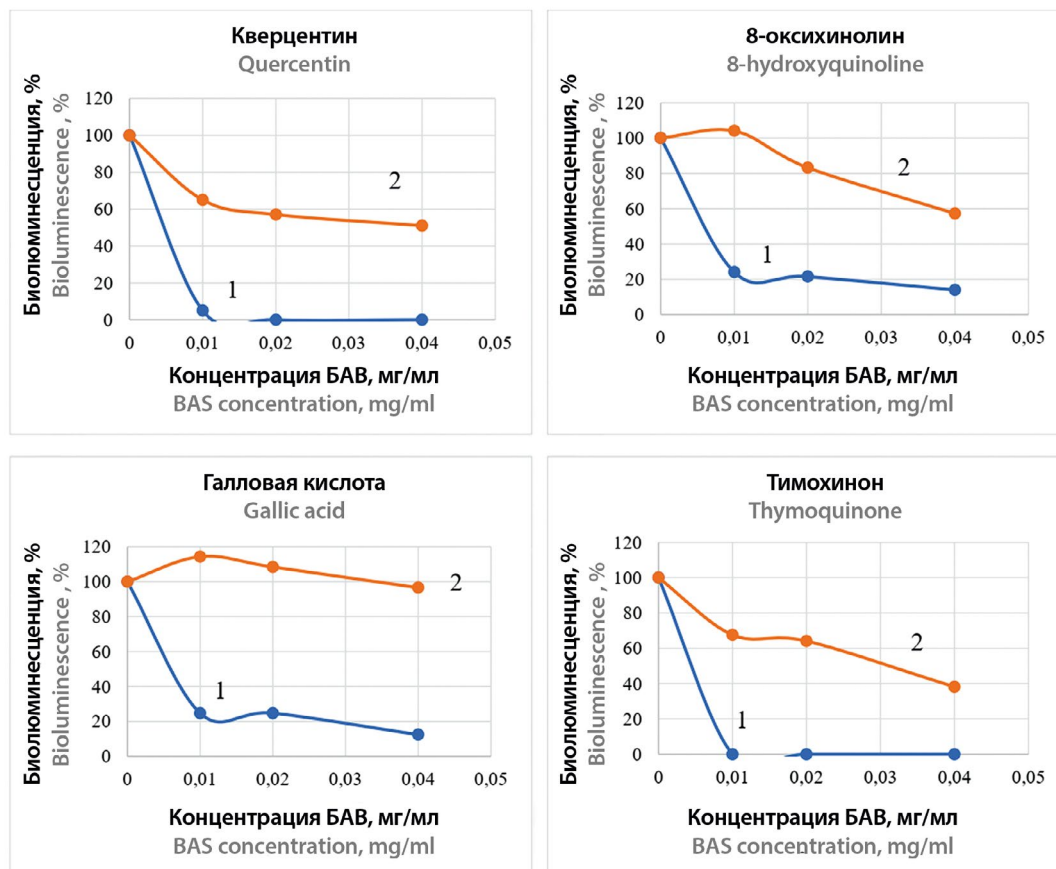


Рисунок 3. Действие БАВ на биолюминесценцию тест-бактерий с конститутивной биолюминесценцией:

1 – *A. fischeri* F1; 2 – *E. coli* (pXen7)

Figure 3. The effect of BAS on bioluminescence of test-bacteria with constitutive bioluminescence:

1 – *A. fischeri* F1; 2 – *E. coli* (pXen7)

центрациях до 40 мкг/мл. Низкой чувствительностью характеризуются бактерии и к действию кверцетина, в присутствии которого биолюминесценция снижается до 70–60 %.

При более высоких концентрациях ингибирующее действие 8-гидроксихинолина и тимохинона усиливалось, а кверцетина и галловой кислоты оставалось практически без изменений (рисунок 4). В этих условиях биолюминесценция *A. fischeri* F1 полностью подавлялась и была близка к 0.

Для изучения бактерицидного действия исследуемые БАВ инкубировали с тест-бактериями в течение суток при комнатной температуре, после чего производили высев на плотную питательную среду в виде каплей объемом 3 мкл (спот-тест). Ингибирование или отсутствие роста тест-бактерий считали проявлением бактерицидности. Как видно из рисунка 5, рост бактерий *A. fischeri* F1 полностью подавлялся всеми исследуемыми веществами при концентрациях от 0,02 мг/мл и выше. Что касается *E. coli* (pXen7), то бактерицидное действие отмечено только для тимохинона при концентрации более 0,2 мг/мл.

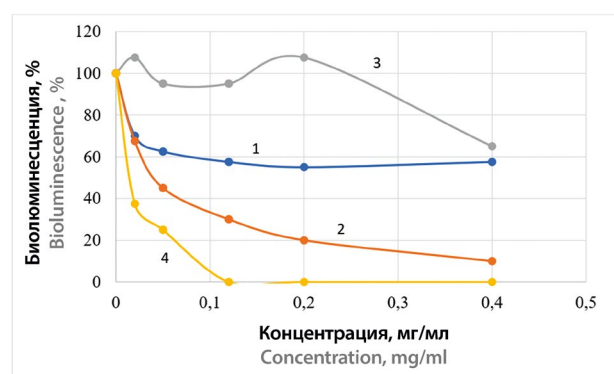


Рисунок 4. Действие БАВ на биолюминесценцию *E. coli* (pXen7) при высоких концентрациях:

1 – кверцетин; 2 – 8-гидроксихинолин; 3 – галловая кислота; 4 – тимохинон. Время воздействия 60 мин

Figure 4. The effect of BAS on the bioluminescence of *E. coli* (pXen7) at high concentrations:

1 – quercetin; 2 – 8-hydroxyquinoline; 3 – gallic acid; 4 – thymoquinone. Exposure time 60 min

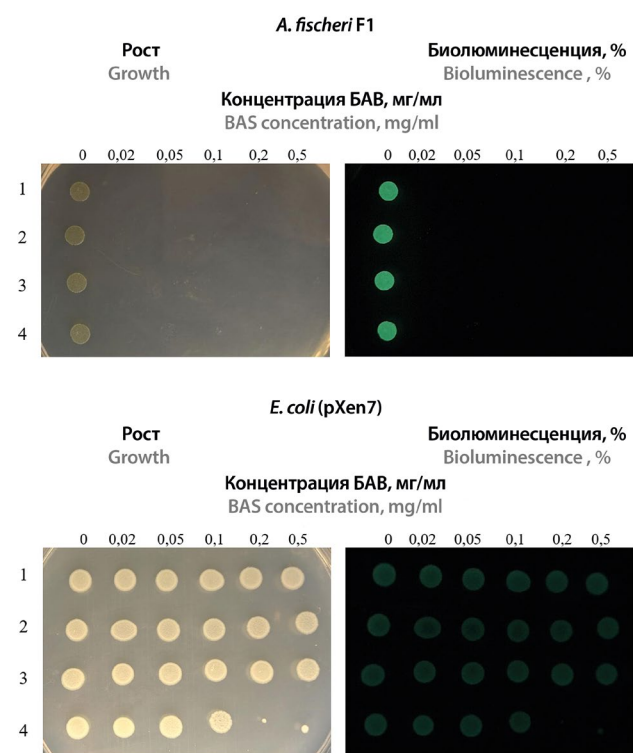


Рисунок 5. Рост и биолуминесценция тест-бактерий на плотной питательной среде в присутствии БАВ:

1 – кверцетин; 2 – 8-гидроксихинолин; 3 – галловая кислота; 4 – тимохинон

Figure 5. Growth and bioluminescence of test-bacteria on a solid nutrient medium at the presence of BAS:

1 – quercetin; 2 – 8-hydroxyquinoline; 3 – gallic acid; 4 – thymoquinone

Определенный интерес представляет сравнение результатов по антибактериальной активности БАВ, полученных с использованием биолуминесцентного анализа, с данными классических микробиологических методов на патогенных микроорганизмах. Анализ литературных данных показал, что все вещества ингибируют рост *S. aureus* (грамположительных) и *E. coli* (грамотрицательных), а также ряда других видов патогенных (условно патогенных) бактерий (таблица 1). Что касается бактерицидного действия, то по крайней мере для кверцетина, 8-гидроксихинолина и тимохинона такое действие установлено и минимальные бактерицидные концентрации (МБК) находятся в пределах от 12 до 120 мкг/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что неспецифическая антимикробная активность БАВ растительного происхождения проявляется в ингибировании бактериальной биолуминесценции, что может быть связано с тем, что свечение является интегральным количественным показателем метаболизма бактериальной клетки. Также следует отметить, что морские тест-бактерии *A. fischeri* F1 обладают значительно большей чувствительно-

стью к действию исследуемых БАВ растительного происхождения по сравнению с рекомбинантным штаммом *E. coli* (pXen7).

Таблица 1. Сравнительный анализ антибактериальной активности БАВ

Table 1. Comparative analysis of BAS antibacterial activity

Биолуминесцентный анализ Bioluminescent assay				Тест-штамм Test-bacteria	МИК ¹ MIC ¹	МБК ² MBK ²	Источник References
A.°fisheri F1		E.°coli (pXen7)					
ЭК ₅₀ EC ₅₀	МБК MBC	ЭК ₅₀ EC ₅₀	МБК MBC				
мкг/мл mcg/ml					мкг/мл mcg/ml		
Кверцетин Quercetin							
2,4	<20	>50	>500	S. aureus	20	50	[15, 16]
				E. coli	400	>500	
				P. aeruginosa	20	50	
8-гидроксихинолин 8-hydroxyquinoline							
6,0	<20	40	>500	S. aureus	2–10	25	[17]
				E. coli	32	128	
				P. aeruginosa	256	нет данных	
Галловая кислота Gallic acid							
6,9	<20	>400	>500	S. aureus	1750	>5000	[18]
				E. coli	93	5000	
				P. aeruginosa	500	500	
Тимохинон Thymoquinone							
2,2	<20	15	200	S. aureus	3,1	12,5	[19]
				E. coli	100	100	
				P. aeruginosa	1,56	1,56	

Примечание. ¹ МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

² МБК – минимальная бактерицидная концентрация.

Note. ¹ MIC – minimal inhibitory concentration.

² MBK – minimal bactericidal concentration.

Еще один важный вопрос связан с тем, как действуют БАВ растений на бактериальные клетки и в чем состоит механизм их антибактериальной активности. Отмечается, что кверцетин обладает широким спектром биологической активности. Установлено его противоопухолевое, бактериостатическое и антиоксидантное действия [15]. В то же время было показано, что кверцетин может обладать прооксидантным, мутагенным и цитотоксическим действиями. Среди механизмов его антибактериальной активности отмечают действие на мембраны клеток, взаимодействие с белками. Из-за низкой растворимости кверцетина в воде его биологическая активность ограничена низкой биодоступностью [16]. Хинолины, гетероциклические соединения, лежащие в основе ряда алкалоидов, известны своей антибактериальной и антисептической активностью, а также

хелатирующими свойствами [17]. Фенольные соединения, такие как галловая кислота и ее производные, также известны своей антибактериальной активностью, которую связывают с действием на клеточные мембраны, взаимодействием с белками, ингибированием ферментов [18].

Тимохинон обладает широким спектром биологической активности, включая антибактериальную, направленную против грамположительных и грамотрицательных патогенов. Показано, что он ингибирует биопленкообразование, а также оказывает антимикробный эффект за счет генерирования активных форм кислорода [19].

В данной работе для изучения механизмов антибактериального действия были использованы четыре биолюминесцентных биорепортерных штамма [7]. Из них *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux) реагируют индукцией биолюминесценции на повреждение нуклеиновых кислот, а *E. coli* (pKatG-lux) и *E. coli* (pSoxS-lux) активируются окислительным стрессом, вызванным перекисью водорода и супероксид-анионами соответственно. Реакции биорепортерных штаммов на соответствующие специфические индукторы, которые были использованы в качестве положительных контролей (K+), приведены на рисунке 6.

Исследование индуцирующего действия БАВ показало, что все они вызывают активацию биолюминесценции *E. coli* (pSoxS-lux). Также для кверцетина наблюдалась незначительная активация биолюминесценции *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux). Тимохинон и галловая кислота при этом вызвали незначительную индукцию биолюминесценции *E. coli* (pKatG-lux) (рисунок 7).

Полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на антиоксидантные свойства исследуемых БАВ [3], их антибактериальное действие может быть

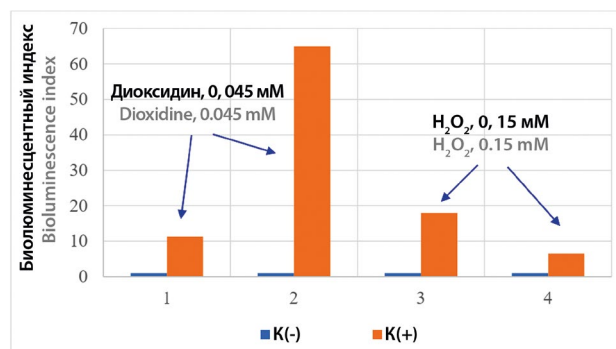


Рисунок 6. Действие специфических индукторов на биолюминесценцию биорепортерных штаммов:

1 – *E. coli* (pRecA-lux) 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux). K(–) – контрольные пробы без добавления индукторов, K(+) – пробы с добавлением специфических индукторов

Figure 6. The effect of specific inducers on bioluminescence of bioreporter strains:

1 – *E. coli* (pRecA-lux) 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux). K(–) – control samples without the addition of inducers, K(+) – the samples with the addition of inducers

связано с окислительным стрессом. Как уже отмечалось, прооксидантное действие ранее было показано для кверцетина и тимохинона [16, 19]. Кроме этого, по крайней мере для кверцетина антибактериальная активность может быть также связана с ДНК-тропностью и повреждением нуклеиновых кислот (активация биолюминесценции *E. coli* (pRecA-lux) и *E. coli* (pColD-lux)). Следует отметить, что низкие значения БИ (1,5–2,5, за исключением 8-оксихинолина), которые являются показателями индукции биолюминесценции, могут означать, что выявленные механизмы не являются основными, а имеют второстепенный характер.

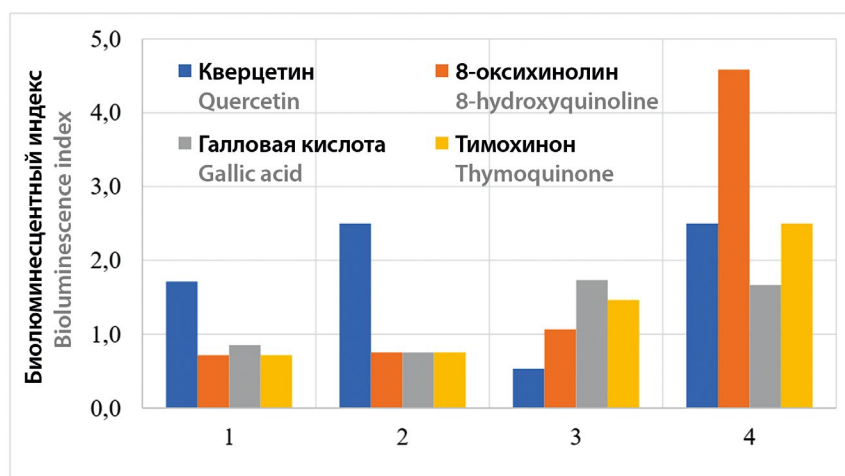


Рисунок 7. Действие БАВ на биолюминесценцию биорепортерных штаммов:

1 – *E. coli* (pRecA-lux); 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux)

Figure 7. The effect of BAS on bioluminescence of bioreporter strains:

1 – *E. coli* (pRecA-lux), 2 – *E. coli* (pColD-lux); 3 – *E. coli* (pKatG-lux); 4 – *E. coli* (pSoxS-lux)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе установлено, что интенсивность свечения природных и рекомбинатных биолюминесцентных бактерий может быть показателем антибактериальной активности БАВ природного происхождения. Показана высокая чувствительность бактерий *A. fischeri* F1 к действию таких веществ, как кверцетин, 8-гидроксихинолин, галловая кислота и тимохинон, для которых МИК (ЭК₅₀) были в пределах 2–7 мкг/мл. Бактерицидный эффект проявлялся при 20 мкг/мл. Учитывая, что биолюминесцентный анализ является количественным инструментальным методом [20], он может быть легко адаптирован для проведения высокопроизводительного фармацевтического скрининга растительного сырья на антибактериальную активность.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;53(4):371–382. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.
2. Hemeg H. A., Moussa I. M., Ibrahim S., Dawoud T. M., Alhaji J. H., Mubarak A. S., Kabli S. A., Alsubki R. A., Tawfik A. M., Marouf S. A. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(12):3221–3227. DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.08.015.
3. Porras G., Chassagne F., Lyles J. T., Marquez L., Dettweiler M., Salam A. M., Samarakoon T., Shabih S., Farrokhi D. R., Quave C. L. Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chemical Reviews*. 2021;121(6):3495–3560. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00922.
4. Eloff J. N. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1):106. DOI: 10.1186/s12906-019-2519-3.
5. Bittner Fialová S., Rendecková K., Mučaji P., Nagy M., Slobodníková L. Antibacterial Activity of Medicinal Plants and Their Constituents in the Context of Skin and Wound Infections, Considering European Legislation and Folk Medicine—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10746. DOI: 10.3390/ijms221910746.
6. Burdejova L., Tobolkova B., Polovka M., Neugebauerova J. Differentiation of Medicinal Plants According to Solvents, Processing, Origin, and Season by Means of Multivariate Analysis of Spectroscopic and Liquid Chromatography Data. *Molecules*. 2023;28:4075. DOI: 10.3390/molecules28104075.
7. Safronyuk S. L., Sharipov E. T., Katsev A. M. Identification of luminous bacteria isolated from the Black and the Azov seas. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2017;5-6:19–23. (In Russ.)
8. Burtseva Ye. V., Kuldyrkaeva E. V., Mekhonoshina I. S., Timasheva L. A., Pekhova O. A., Katsev A. M. Chemical composition and biological activity of *Hyssopus officinalis* L. hydrolates. *Medical & pharmaceutical journal "Pulse"*. 2023;25(3):25–34. (In Russ.) DOI: 10.26787/nydha-2686-6838-2023-25-3-25-34.
9. Antypenko O. M., Antypenko L. M., Kovalenko S. I., Katsev A. M., Achkasova O. M. Potential of N-aryl (benzyl, heteryl)-2-(tetrazolo[1,5-c]quinazolin-5-ylthio)acetamides as anticancer and antimicrobial agents. *Arabian Journal of Chemistry*. 2016;9(6):792–805. DOI: 10.1016/j.arabjc.2014.09.009.
10. Suppi S., Kasemets K., Ivask A., Künnis-Beres K., Sihtmäe M., Kurvet I., Aruoja V., Kahru A. A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;286(9):75–84. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.027.
11. Chugunova E., Boga C., Sazykin I., Cino S., Micheletti G., Mazzanti A., Sazykina M., Burilov A., Khmelevtsova L., Kostina N. Synthesis and antimicrobial activity of novel structural hybrids of benzofuran and benzothiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;93:349–359. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.02.023.
12. Li Y., He X., Zhu W., Li H., Wang W. Bacterial bioluminescence assay for bioanalysis and bioimaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(1):75–83. DOI: 10.1007/s00216-021-03695-9.
13. Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*. 2006;32(2):265–268. DOI: 10.1016/j.envint.2005.08.022.
14. Kováts N., Ács A., Göllöncsér F., Barabás A. Quantifying of bactericide properties of medicinal plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(6):777–779. DOI: 10.4161/psb.6.6.15356.
15. Salehi B., Monzote L., Sharifi-Rad J., Ezzat S. M., Saleem M. A., Merghany R. M., El Mahdy N. M., Kılıç C. S., Sytar O., Sharifi-Rad M., Sharopov F., Martins N., Martorell M., Cho W. C. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*. 2020;5(20):11849–11872. DOI: 10.1021/acs.omega.0c01818.
16. Carrillo-Garmendia A., Madrigal-Perez L. A., Regalado-Gonzalez C. The multifaceted role of quercetin derived from its mitochondrial mechanism. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2023. DOI: 10.1007/s11010-023-04833-w.
17. Cherdrakulkiat R., Lawung R., Nabu S., Tantimavanich S., Sinthupoom N., Prachayasittikul S., Prachayasittikul V. Nitroxoline: a potent antimicrobial agent against multidrug resistant Enterobacteriaceae. *EXCLI Journal*. 2019;18:445–453. DOI: 10.17179/excli2019-1378.
18. Borges A., Ferreira C., Saavedra M. J., Simões M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(4):256–265. DOI: 10.1089/mdr.2012.0244.
19. Goel S., Mishra P. Thymoquinone inhibits biofilm formation and has selective antibacterial activity due to ROS generation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(4):1955–1967. DOI: 10.1007/s00253-018-8736-8.
20. Niwa K., Kubota H., Enomoto T., Ichino Y., Ohmiya Y. Quantitative Analysis of Bioluminescence Optical Signal. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(2):223. DOI: 10.3390/bios13020223.