

УДК 57.083.137

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА AEROCOCCUS ВИДА AEROCOCCUS VIRIDANS

Кременчуцкий Г.Н., Степанский Д. А.,
Кошечкина И.П., Турлюк С.А.

ГУ "Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины"

Для визуализации биохимической активности микроорганизмов рода *Aerococcus* вида *Aerococcus viridans* разработана индикаторная среда, содержащая калия йодид, натрия селенит и растворимый крахмал. Индикаторная среда позволяет визуализировать оксидазные и редуктазные свойства аэрококков и других микроорганизмов и может быть использована для изоляции и идентификации аэрококков из контаминированных биологических материалов. При росте оксидазо-положительных микроорганизмов происходит окисление КJ до J₂ и возникает тёмно-фиолетовое окрашивание среды. Окрашивание колоний микроорганизмов в красный цвет свидетельствует о восстановлении Se₂ из его соли. Использование варианта минимальной (голодной) индикаторной среды позволяет визуализировать ферментативные и химические взаимодействия аэрококков и их бесклеточных комплексов с соответствующими субстратами. Предлагаемая индикаторная среда может быть использована для микробиологических, генетических исследований, микробиологического определения аминокислот, витаминов, азотистых оснований с помощью гетеротрофных культур аэрококков.

Аэрококки являются грамположительными каталазоотрицательными микроорганизмами широко распространенными в окружающей среде и в микробиоценозах холоднокровных [1,2] и теплокровных организмов [3]. В настоящее время насчитывается 7 видов представителей рода *Aerococcus* [4]. Вид *A. viridans* получил своё наименование в результате позеленения кровяного агара вокруг растущих колоний. Было установлено, что одним из продуктов при росте *A. viridans* является перекись водорода, оказывающая антагонистическое действие на разные виды бактерий "in vitro" и "in vivo" [5]. В дальнейшем было установлено, что перекись водорода и супероксидный радикал продуцируются в результате функционирования NAD-независимой лактатоксидазы [6,7] и пируватоксидазы [8].

Окислительная способность *A. viridans* является дифференциальным признаком и позволяет визуализировать эти свойства с использованием специфической индикаторной среды [9]. Нами были исследованы модификации индикаторной среды (ИС), включающей в свой состав йодид калия, растворимый крахмал и натрия селенит, позволяющие расширить возможности визуализации при исследовании оксидазной и редуктазной активностей *A. viridans*.

Материалы и методы

Для изучения оксидазно-редуктазной активности использовались ауто-симбионтные культуры *A. viridans*, выделенные у людей, промышленный штамм *A. viridans* 167, использующийся для приготовления "А-бактерина", культура *Aureobasidium pullulans* B5, изолированная из почвы и обладающая глюкозоксидазной активностью [10]. Разработанные индикаторные среды тестировались также, при выделении культур аэрококков, обладающих лактатоксидазной активностью из биоматериалов от птиц и млекопитающих.

В качестве основы для индикаторной среды (ИС) была выбрана среда ИС1 следующего состава (г на 1 л воды):

Йодид/калия	26,0
Растворимый крахмал	10,0
Питательный агар	30,0

Среда готовилась по вышеизложенной рецептуре. Автоклавирование проводилось при 1,5 атм. 30 мин. Аэрококки выращивались при 37°C в течение 24-48 часов. Для учета индикаторной реакции (ИР) на поверхность чашки наносили 5 мл 10% H₂SO₄. Через 3-5 мин производился учёт ИР в виде появления тёмно-фиолетовых зон вокруг роста бактерий (рис.1). Метод очень чувствительный, но его недостатком является невозможность сохранения жизнеспособности культур после обработки чашек 10% H₂SO₄.

Для сохранения жизнеспособности культур микроорганизмов после учёта ИР в составе ИС1 была увеличена концентрация КJ до 26-30 г на 1 л среды, в результате чего получаем новую индикаторную среду (ИС2). В процессе роста колонии аэрококков на этой среде окрашиваются в тёмно-фиолетовый цвет без дополнительной обработки серной кислотой (рис.2). ИС2, помимо учёта ИР чистых культур, может быть использована для выделения аэрококков из контаминированного биологического материала, так как она позволяет дифференцировать колонии, продуцирующие H₂O₂, среди других колоний, не обладающих этим свойством.

A. viridans, обладая лактатоксидазной активностью (не имея цитохромоксидаз, каталазы для защиты от активных форм кислорода (АФК) содержит ферменты антиоксидатной защиты (АОЗ) (глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу, супероксиддисмутазу). Одним из визуальных проявлений АОЗ микроорганизмов является их способность восстанавливать Se₂ из его солей, что ведёт к окрашиванию колоний микроорганизмов в красный цвет. С целью учёта Se-редуктазной активности аэрококков в ИС2 на 1 л среды добавляется 1 г Na₂SeO₃ (ИС3). В зависимости от отношения оксидазной и редуктазной активностей рост аэрококков индуцирует разную ИР (рис.3.4.5)

Для визуализации оксидазно-редуктазных активностей бесклеточных компонентов аэрококков на основе ИС3 была разработана ИС4, в которой вместо водопроводной воды использовалась дистиллированная вода после двойной очистки, а вместо стандартного питательного агара использовался высокоочищенный агар-агар.

Результаты и обсуждение

ИС1 использовалась для проверки окислительных свойств культур аэрококков. ИР проявлялась появлением тёмно-фиолетовой окраски, после обработки поверхности чашек 10% серной кислотой (рис.1). Чётко видны зоны тёмно-фиолетового окрашивания в области роста культуры, обладающей лактаксидазной активностью. Для изоляции колоний



Рис.1. ИР на ИС1 вокруг роста *A.viridans* после обработки H_2SO_4

аэрококков из контаминированного биологического материала может быть использована ИС2 с повышенным содержанием КЖ, на которой без обработки поверхности среды 10% H_2SO_4 среди колоний сопутствующих микроорганизмов через 2-5 суток появляются тёмно-фиолетовые колонии, предположительно, *A. viridans* (ox^+) (рис.2), окислительные свойства чистых культур которых проверяются на ИС1.



Рис.2. Рост ox^+ колоний *A.viridans* на ИС2

Для визуализации редуцтазной активности микроорганизмов использовалась ИС3, в состав которой был введен натрия селенит в концентрации 1 г/л.

При росте аэрококков селен восстанавливается с появлением красного окрашивания в зонах роста культур и колоний (рис.3,4,5).



Рис.3. Окрашивание роста бактерий в процессе восстановления Se_2



Рис.4 Восстановление Se_2 и окисление КЖ колониями аэрококков



Рис.5. Активность разных культур *A. viridans* (посев бляшками)

Индикаторная реакция этой среды позволяет дифференцировать культуры аэрококков по способности окислять йодид калия или восстанавливать селен с делением их на три биотипа Первый биотип - культуры аэрококков преимущественно окисляющие КЖ (колонии интенсивно фиолетового цвета с такими же зонами окраски вокруг), второй биотип – культуры аэрококков, преимущественно восстанавливающие селен (колонии красного цвета) и третий биотип – культуры, проявляющие оба вида активности при росте на ИС3 (тёмно-фиолетовые зоны окраски вокруг красных колоний).

Питательная индикаторная среда ИС3, содержащая повышенную концентрацию КЖ, может быть использована для выделения и исследования окислительной способности разных микроорганизмов, продуцирующих перекись водорода при окислении биологических субстратов. На рисунках (6,7,8) приведены фото реакции среды при росте *Aureobasidium pullulans* B5, изолированного из почвы и обладающего глюкозооксидазной активностью [10]. При выделении культуры *A. pullulans* B5 с целью выявления глюкозооксидазной активности колоний в состав ИС3 вводилась глюкоза в повышенной концентрации (5-10%).



Рис.6. Рост *A. pullulans* при выделении из почвы на ИС3



Рис.7. Рост чистой культуры *A. pullulans* на ИС3

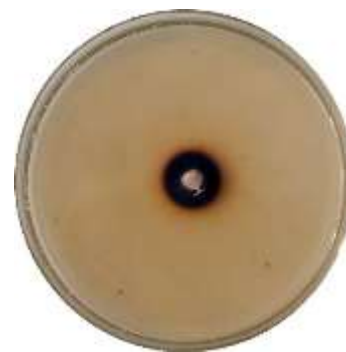


Рис.8. Реакция ИС3 вокруг бляшки *A. pullulans*

При контаминации среды из воздуха на ИС3 могут вырасти культуры микроорганизмов, использующие неидентифицируемые субстраты окисления, содержащиеся в питательной среде. На рисунках (9,10,11)

представлены чашки с ростом плесневых микроорганизмов, инициирующих при своем росте ИР.



Рис.9. ИР при воздушной контаминации ИС3.



Рис.10. ИР при росте чистой культуры плесневого контаминанта на ИС3



Рис.11.Кольцо окисления КJ вокруг плесневого контаминанта

Возможности применения индикаторных сред для визуализации окислительно-восстановительных свойств микроорганизмов и их биологических компонентов значительно расширяются при использовании синтетической основы в виде высокоочищенного агар-агара

(ИС4). ИС4 даёт прямую ИР при внесении перекиси водорода в заранее подготовленные лунки. Представленные фотографии чашек демонстрируют возможность титрования разных концентраций перекиси водорода.



Рис.12. Зоны ИР при концентрациях H_2O_2 1-10000 мкг/мл



Рис.13. Зоны ИР при концентрациях H_2O_2 1,25 -10 мкг/мл



Рис.14. Кривая зависимости диаметра зоны ИР от концентрации H_2O_2

На рис.14 видно, что кривая приобретает экспоненциальный характер в промежутке между концентрациями H_2O_2 от 1,25 до 10 мкг/мл. Наиболее видимая реакция среды начинается с концентрации 2,5 мкг/мл, т.е. с 0,00025 % H_2O_2 .

На следующих фотографиях показаны чашки с минимальной индикаторной средой № 4, на поверхность которой был нанесен газом *A. viridans* 167. На минимальной (голодной) среде аэрококки не растут, так как они являются гетеротрофами. В центр помещен нейтральный цилиндр и закапано 0,2 мл 0,01% молочной кислоты (МК).



Рис.15. Зона ИР на газоне *A. viridans* 167 при диффузии МК через 24 часа



Рис.16. Зона ИР на газоне *A. viridans* 167 при диффузии МК через 72 часа



Рис.17. Окончательная стабилизация ИР на газоне *A. viridans* 167 с внутренней зоной отсутствия ИР после 72 часов

Видно последовательное развитие реакции на ИС4 по мере диффузии МК и её окисления клетками *A. viridans*. Отмечается кольцообразное развитие окраски с зонами её отсутствия внутри диффузии МК. Это явление может быть объяснено за счёт смены оксидантной активности на пероксидазную при включении антиоксидантных механизмов в определённых кольцевых зонах. Было отмечено образование микроколоний, вырастающих, по-видимому, за счёт окисления молочной кислоты.

ИС4 позволяет изучать биохимическую активность ферментного комплекса (ФК), полученного с по-

мощью ультразвука (УЗ) из тщательно отмытой биомассы аэрококков [11], и биосубстратов. На фото №18 видна зона окраски вокруг цилиндра с ФК (лактатоксидаза), инициированная диффундирующей молочной кислотой (МК). При диффузии МК кольцо ИР всегда образуется вокруг цилиндра, содержащего ФК. На фото № 19 наблюдается ИР вокруг лунки в агаре с H_2O_2 (10 мкг/мл). Была изучена визуализация участия глутатиона восстановленного (GSH) в реакции ФК на ИС4. На чашке № 20 в цилиндр закапано 0,1 мл (10 мкг/мл) GSH. Сам глутатион восстановленный не вызывает явно видимой ИР.

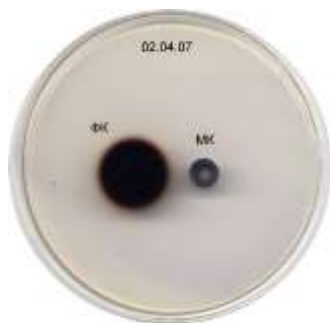


Рис.18. IP на ИС4 при окислении МК в зоне ФК



Рис.19. IP на ИС4 в зоне диффузии H₂O₂ (10 мкг/мл)



Рис.20. IP на ИС4 (слабо красная зона) при внесении 0,1 мл GSH (10мг/мл)

Антиокислительное действие глутатиона восстановленного проявляется при параллельном внесении в рядом расположенную лунку H₂O₂ и проведении ферментативной реакции между ФК и МК. На фото № 21 видна нейтрализация IP диффундирующим GSH в

зоне действия H₂O₂. При раздельном внесении в отстоящие друг от друга лунки в агаре GSH и ФК (фото №22) IP отсутствует. На фото №23 чётко видна нейтрализация IP при диффузии GSH в зону взаимодействия МК с ФК.



Рис.21. Нейтрализация IP в зоне H₂O₂ диффундирующим GSH



Рис.22.Отсутствие окислительной IP при раздельном внесении GSH и ФК



Рис.23. Нейтрализация IP в зоне реакции МК & ФК диффундирующим GSH

В то же время, наблюдается противоположная картина при соединении GSH и ФК.



Рис.24. Восстановление Se₂ при взаимодействии ФК с GSH



Рис.25. Развитие IP через 48 часов (ФК & GSH)



Рис.26. Нейтрализация комплексом "ФК & GSH" IP среды на H₂O₂

рис. 24,25,26 представлена редуктазная ИР в виде кольцеобразного восстановления Se₂ при совместном внесении ФК и GSH в лунки на ИС4, по-видимому, за счёт активности ферментного комплекса, обеспечивающего Se-редуктазную активность. Подобно оксидазной ИР (рис. 15,16, 17) было установлено фазовое изменение редуктазной ИР (восстановление селена) при взаимодействии ФК с GSH, по сути, кольцевого разделения активного компонента.

Нами рассмотрены далеко не все возможности предлагаемых вариантов индикаторной среды, базирующейся на содержании КJ, растворимого крахмала и солей селена. Данная среда применима при исследовании ауксотрофных мутантов с нарушением продукции H₂O₂ или восстановления селена. Среда применима, также, для микробиологического определения аминокислот, витаминов, азотистых оснований в биообъектах, так как аэрококки являются гетеротрофами по этим элементам.

Выводы

1. Индикаторные питательные среды ИС1 и ИС2, содержащие КJ и растворимый крахмал позволяют визуализировать окислительную способность аэрококков и направленно изолировать их и другие микроорганизмы из контаминированных биопродуктов (вода, воздух, почва, биологические жидкости).
2. Индикаторная питательная среда ИС3 даёт возможность одновременно с оксидазной активностью микроорганизмов визуализировать их редуктазную активность при восстановлении селена с делением на биологические типы.
3. Минимальная (голодная) ИС4 позволяет наблюдать за взаимодействием ферментного комплекса аэрококков с субстратами окисления и восстановления с дальнейшей экстраполяцией результатов на роль аэрококков в микробиотопе макроорганизма.

References:

1. Battison A.L. Response of American lobsters *Homarus americanus* to infection with field isolate of *Aerococcus viridans* var. *Homari* (Gaffkemia): survival and hematology / A.L. Battison, R.J. Cawthorn, B. Horney // *Dis Aquat Organ.* – 2004. – Vol. 61, №3. – P. 263-268.
2. Torrent A. Esophageal diverticulum associated with *Aerococcus viridans* infection in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*) / A.Torrent [et al.] // *J Wildl Dis.* – 2002. – №38. – P. 221-223.
3. Sharun A.V. Comparative analysis of aerococci biological properties, isolated from different ecological niches of the human body [Text] / A. Sharun, A.A. Nikulin, G.M. Kremenchutsky // *Medical perspectives.* – 2005 – Vol. X, №3. – P.72-78.
4. *Aerococcus* entry in LPSN [Euzéby, J.P. "List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet". *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 47, N2. – P. 590–592.
5. Kremenchutsky G.N. Comparative evaluation of antagonistically reactive oxygen of physical and biological origin [Text] / G.N. Kremenchutsky, L.G. Yurgel, A.V.

Sharun // XII International Scientific Conference and discussion club "New information technologies in medicine and ecology": Crimea, Yalta Gurzuf., 2004. – P. 180.

6. Kremenchutsky G.N. Lactate-oxidase activity of *Aerococcus viridans* cultures [Text] / G.N. Kremenchutsky, P.Y. Arenkov // *Microbiol. J* – 1989. – Vol.5, №5. – P.17-20.

7. Furuichi M. X-ray structures of *Aerococcus viridans* lactate oxidase and its complex with D-lactate at pH 4.5 show an alpha-hydroxyacid oxidation mechanism / M. Furuichi [et al.] // *J Mol Biol.* 2008. – 25 ;378(2). – P. 436-446.

8. Juan E.C. The structures of pyruvate oxidase from *Aerococcus viridans* with cofactors and with a reaction intermediate reveal the flexibility of the active-site tunnel for catalysis.(E.C. Juan [et al.] // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2007. – Vol. 1, N63. – P. 900-907.

9. Kremenchutsky G.N. AS №1494516 USSR. Nutrition medium for determination of lactate-oxidative activity of *Aerococcus viridans* / Publ. in BJ 1989, № 2610.

10. Smotrova N.G. Isolation of strains of microorganisms with glucose-oxidative activity, from the environment [Text] / N.G. Smotrova, G.N. Kremenchutsky // *Mikrobiol. J.* – 2002. – Vol. 64, № 6. – P. 28-34.

11. Valchuk S.I. Biological properties of aerococci and bacilli - components of the new associative probiotic complex [Text] / S.I. Valchuk [et al.] // *Visn.Dnipropetr.Univ.Ser.Biol.Med.* – 2015. – Vol.6, N1. – P. 57-62.

UDC 57.083.137

VISUALIZATION OF BIOCHEMICAL ACTIVITY OF MICROORGANISMS GENUS AEROCOCCUS SPECIES AEROCOCCUS VIRIDANS

Kremenchutsky G.N., Stepansky D.O., Koshevaya I.P., Turlun S.A.

Introduction. *Aerococci* are catalase-negative Gram-positive microorganisms, widespread in the environment, in the cold-blooded microbiocenoses [1, 2] and warm-blooded organisms [3]. Currently, there are seven species of the *Aerococcus* genus [4]. Type *A. viridans* got its name as a result of greening blood agar around the growing colonies. It was found that one of the products of *A. viridans* growth is hydrogen peroxide, has an antagonistic effect on various kinds of bacteria "in vitro" and "in vivo" [5]. It was subsequently found that hydrogen peroxide and superoxide radical are produced as a result of NAD-independent lactatoxidase [6,7] and piruvatoxidase functioning[8]. The oxidative ability of *A. viridans* is a distinctive feature and allows to visualize these properties using a specific indicator medium [9]. We have developed an indicator that enables to visualize oxidation and reduction properties of aerococci.

Material & methods. Auto-symbiotic cultures of *A. viridans* was used for studying of oxidase - reductase activity, inoculated from human body, an industrial strain of *A. viridans* 167, used for the preparation of "A-bacterin", culture of *Aureobasidium pullulans* B5, isolated from the soil and having glucose oxidase activity [10]. Designed indicating medium were also tested in the inoculation of aerococci crops, having lactatoxidase activity of bio-

materials from birds and mammals. As a basis for the indicating media (IM) IM1 media was selected with following composition (g per 1 liter of water) Iodide / potassium 26.0 Soluble starch 10.0 Nutrient agar 30.0 For visualization of oxidase-reductase activity of aerococci acellular components IM4 was developed based on IM3, in which distilled water after double purification was used instead of tap water and highly purified agar-agar was used instead of standard nutrient agar.

Results & discussion. IM1 is used to test the oxidative properties of aerococci crops. IM manifests the appearance of a dark purple color, after processing the surface of cups with 10% sulfuric acid. Dark purple areas with lactoxidase activity in the growth zone of the culture are clearly visible. IM2 with high content of KJ can be used for isolation of aerococci colonies from contaminated biological material. IM3 with sodium selenite at a concentration of 1 g / l was used to visualize the reductase activity of microorganisms. Selenium recovered with the advent of the red color in the areas of crop growth and the colonies while growth of aerococci. Nutrient indicator medium IM3, containing an increased concentration of KJ, can be used for isolation and studying the oxidizing ability of different microorganisms which produce hydrogen peroxide in the oxidation of biological substrates. IM4 allows us to study the biochemical activity of the enzyme complex (EC) obtained by ultrasound (US) from washed thoroughly biomass of aerococci [11] and biological substrates. **Conclusion.** 1. Indicator nutrient mediums IM1, IM2, containing the KJ and soluble starch allows to visualize the oxidizing power of aerococci and isolate them together with another microorganisms from contaminated biological products (water, air, soil, biological fluids). 2. The indicator nutrient media IM3 allows (simultaneously with oxidase activity of microorganism) to visualize reductase activity in the reduction of selenium with classification on biological types. 3. Minimal (hungry) IM4 allows us to observe the interaction between aerococci enzyme complex and substrates of oxidation and reduction, with further extrapolation of the results to the role of aerococci in microbiotope of host organism. The proposed indicator media can be used for microbiological and genetic studies, microbiological determination of amino acids, vitamins and nitrogenous bases.