

Pokroky vo výskume biochemického účinku vybratých antimikróbnych látok a mechanizmov rezistencie mikroorganizmov proti nim

J. ŠUBÍK

Hygienickú nezávadnosť požívatín, jedno zo základných kritérií ich kvality, rozhodujúcou mierou ovplyvňuje mikroflóra surovín (mikroorganizmy, toxíny), hygienické podmienky výroby (mikrobiologické faktory výrobných priestorov a zariadení, voda, vzduch), ako aj použitá metóda úchovy potravín. Požívatiny v prevažnej miere môže znehodnocovať činnosť mikroorganizmov, baktérií, kvasiniek a plesní. Tieto nežiadúce mikroorganizmy popri rozsiahlych stratách na potravinárskych surovinách a výrobkoch spôsobujú aj chemické zmeny potravín, dôsledkom čoho sú nevhodné na konzumáciu, ale navyše môžu vyvolať aj vážne infekcie a otravy po ich požití [1, 2].

Hygienické podmienky výroby závisia od použitia účinných čistiacich a dezinfekčných prostriedkov, ako aj od spôsobov ich aplikácie v sanitačnom procese. Podobne i chemické metódy úchovy potravín závisia od efektívnosti použitých antimikróbnych prídavných látok, ktoré slúžia ako konzervačné činidlá [3].

Z hľadiska súčasných požiadaviek je paleta chemických prostriedkov boja proti mikroorganizmom, používaných v náročných podmienkach potravinárskeho priemyslu, nedostačujúca [4, 5]. Preto sa treba zamerať na výskum, vývoj a aplikáciu nových, biologicky aktívnych látok, ktoré sa použijú jednak na prípravu nových účinných, čistiacich a dezinfekčných prostriedkov pri likvidácii alebo prevencii mikrobiálnej kontaminácie výrobných procesov a zariadení, jednak ako antimikrobiálne látky v kombinácii s inými metódami zabráňujúcimi znehodnocovaniu požívatín mikroorganizmami.

Vo Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave sa v súlade s týmto zameraním riešila v rokoch 1976—1977 vecná etapa „Výskum biochemického účinku antimikróbnych látok“ čiastkovej úlohy rozvoja vedy a techniky P 11-529-264/02. Tento príspevok podáva informatívny súhrn výsledkov riešenia tejto etapy, ktoré v plnom znení uvádza záverečná správa z novembra 1977 [6].

Výsledky práce možno z formálnej stránky rozdeliť na štyri vecné celky.

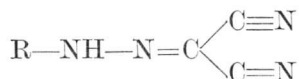
Antimikróbne látky v dezinfekčných procesoch

V súvislosti s nežiadúcou aktivitou mikroorganizmov, ktoré znižujú hygienickú nezávadnosť a tým i celkovú kvalitu potravín, opísali sa prostriedky boja proti týmto škodcom. Dôraz sa kladol na chemické prostriedky, ktoré svojou účinnosťou v dezinfekčných procesoch významne redukujú kontamináciu potravinárskych surovín a ich výrobkov mikroorganizmami.

Analyzovali sa požiadavky, ktoré sa kladú na dezinfekčné prostriedky, používané v náročných podmienkach potravinárskeho priemyslu, a diskutovali sa faktory, ktoré za týchto podmienok významne ovplyvňujú ich účinnosť. V závere sa podal prehľad základných dezinfekčných prostriedkov používaných v potravinárskom priemysle a v súvislosti so sanitačnými procesmi sa prediskutovali niektoré ich fyzikálnochemické a biologické vlastnosti.

Deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu a ich vplyv na rast a metabolizmus mikrobiálnych buniek

Karbonylkanid arylhydrazóny predstavujú skupinu organických zlúčenín všeobecného vzorca



v ktorom R je substituovaný alebo nesubstituovaný arylový radikál, napr. fenyl alebo naftyl. V úsilí využiť vlastnosti týchto zlúčenín v boji proti poľnohospodárskym a potravinárskym škodcom, študovali sme v závislosti od chemickej štruktúry antimikróbnu aktivitu série laboratórne syntetizovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu. Pri desiatich študovaných zlúčeninách, ktoré predstavujú deriváty karbonylkyanidarylhydrazónu obsahujúce voľný alebo substituovaný fenyl v jednej alebo viacerých polohách s halogénom, alkylskupinou, nitroskupinou, acylom alebo halogénalkoxykupinou, biochemickými a mikrobiologickými metódami sme sledovali ich vplyv na rast a metabolizmus baktérií, kvasiniek a vláknitých húb.

Zistili sme, že tieto zlúčeniny už v pomerne nízkych koncentráciách inhibovali rast buniek *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae* a mnohých saprofytických a fytopatogénnych húb, ako sú *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium italicum*, *P. cyclopium*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus nigricans* a *Mucor mudeco*. Účinok testovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, špecificky indukujúcich zvýšenú vodivosť membrán pre protóny a reagujúcich so zlúčeninami buniek obsahujúcich tiol, bol vo vyšších koncentráciách pre vegetatívne bunky mikroorganizmov, ako aj ich spóry letálny.

Zo získaných experimentálnych výsledkov antimikróbnej aktivity sa určili relatívne účinnosti jednotlivých derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu. Po ich korelácii s fyzikálnochemickými vlastnosťami sa zistilo, že maximum biologickej aktivity vykazujú tie deriváty, pri ktorých substituent na benzénovom jadre zapríčiňuje súčasne zvýšenie acidity a lipofily derivátu v porovnaní s nesubstituovaným karbonylkyanidfenylhydrazónom. Túto podmienku

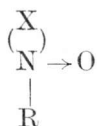
spĺňali najmä 4-trifluórmetoxy-, 3-chlór-, 4-chlór- a 3,4-dichlór-deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu.

Vzhľadom na pomerne jednoduchú chemickú prípravu, vysokú antimikróbnu aktivitu, široké spektrum účinku, známy spôsob účinku, rozpustnosť vo vodných i nevodných rozpúšťadlách študované deriváty karbonylkyanidfenylhydrazónu boli navrhnuté na prípravu širokospektrálnych dezinfekčných prostriedkov, použiteľných v prevencii i v likvidácii nežiadúcich poľnohospodárskych a potravinárskych škodcov. Chemická príprava a biologické vlastnosti študovaných derivátov sú predmetom patentovo-právneho konania.

Antimikróbna aktivita amínoxidov: Spôsob účinku a korelácia štruktúry s aktivitou

Amínoxidy predstavujú veľkú skupinu chemických zlúčenín, odvodených od terciálnych amínov, ktoré obsahujú silne polarizovanú $N \rightarrow O$ väzbu. Mnohé, v prírode sa vyskytujúce alebo chemicky syntetizované amínoxidy sú známe ako antimetabolity, chemoterapeutiká, psychotropné a kancerostatické látky.

Naše experimentálne práce sa zamerali na výskum antimikróbnej aktivity skupiny N-alkylderivátov nasýtených heterocyklických amínoxidov všeobecného vzorca



kde X je heterocyklické jadro (pyrolidín, piperidín, perhydroazepin, morfolín a R linerárny alkyl o počte uhlíkov C_2 až C_{18} .

Pri štúdiu antimikróbnej aktivity amínoxidov sme za reprezentatívnu zlúčeninu vybrali 4-dodecylmorfolín -N-oxid (DMNO). Ako modelové mikroorganizmy sa použili baktérie *Bacillus cereus*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a plesne *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *Penicilium italicum*, *P. roqueforti*, *P. cyclopium*, *P. chrysogenum*, *P. brevi-compactum*, *Mucor mucedo*, *M. racemosus*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus oryzae*, *Rh. nigricans*, *Paecilomyces varioti* a *Fusarium oxysporum*.

Štúdiom vplyvu DMNO na diferenciáciu a rast baktérií zo spórového inokula sme zistili, že DMNO v závislosti od použitej koncentrácie inhiboval klíčenie a postgerminálny vývoj spór *Bacillus cereus*. Účinok DMNO bol pre vegetatívne bunky letálny. Nevyklíčené spóry v prítomnosti DMNO svoju životaschopnosť nestrácali.

Podobne ako rast baktérií, aj rast vlákнитých húb bol inhibovaný DMNO. Najcitlivejšie na inhibičný účinok boli *Botrytis cinerea* a *Paecilomyces varioti*. Spóry plesní v prítomnosti DMNO neboli schopné klíčiť a ich životaschopnosť klesala s rastúcim časom ich interakcie s amínoxidom.

Spôsob účinku DMNO sme podrobnejšie študovali na kvasinke *S. cerevisiae*, ktorej biochemické vlastnosti veľmi dobre poznáme. Zistili sme, že DMNO inhibuje rast buniek kvasiniek v tekutom médiu už v pomerne nízkych kon-

centráciách. Účinok DMNO bol letálny. V prítomnosti rast inhibujúcich koncentrácií DMNO úplne inhiboval anaeróbnú glykolýzu buniek, pričom však bol bez efektu na reakčnú rýchlosť mnohých glykolytických enzýmov, testovaných za podmienok *in vitro*.

Za prítomnosti DMNO bunky kvasiniek neboli schopné oxidovať glukózu. Aj izolované mitochondrie po interakcii s DMNO stratili schopnosť oxidovať jantaran, citrátát, ako aj TMPD + askorbát. Za týchto podmienok ich ATP-ázová aktivita bola silne inhibovaná.

Bunky kvasiniek po pridaní DMNO rýchlo strácali intracelulárny draslík. Po dlhšej inkubácii s DMNO bolo možné pozorovať i uvoľňovanie bunkového materiálu, absorbujúce v UV oblasti do okolitého média, čo poukazuje na rozsiahlosť poškodenia bunkových štruktúr.

Dezorganizácia membránových štruktúr pod vplyvom DMNO sa výraznejšie prejavila za prítomnosti protoplastov kvasiniek inkubovaných v osmoticky stabilizovaných médiách. Rýchlosť i rozsah ich lýzy záviseli od koncentrácie DMNO, času a teploty okolitého prostredia. S rastúcou teplotou cytolytická aktivita DMNO vzrastala a jej priebeh v závislosti od teploty (Arrheniové krivky) vykazoval diskontinuitu pri 16–20 °C.

Na základe získaných výsledkov biochemickej analýzy vplyvu DMNO na metabolizmus *S. cerevisiae* možno vysloviť záver, podľa ktorého dezorganizácia membránových štruktúr, po interakcii mikroorganizmov s amínoxidmi, je primárne zodpovedná za ich antimikróbnu aktivitu.

Tento záver podporuje i štúdium vzájomného vzťahu štruktúry a antimikróbnej aktivity amínoxidov, ktoré navyše dáva cenné informácie i o vplyve jednotlivých substituentov študovaných amínoxidov na ich biologické vlastnosti. V priebehu tohto výskumu sme zistili, že v homológnej sérii 4-alkylmorfolín-*N*-oxidov, obsahujúcich alkylový postranný reťazec o rozličnej dĺžke (C_2 , C_4 ... C_{16} , C_{18}), antimikróbna i cytolytická aktivita vzrastali s rastúcou dĺžkou alkylu. Výrazný zlom v aktivite tejto série derivátov sa pozoroval v okolí alkylu obsahujúceho 10 atómov uhlíka. Optimum aktivity sa nameralo pre 4-hexadecylmorfolín-*N*-oxid.

Kým zmena dĺžky alkylu výrazne vplývala na biologickú aktivitu študovaných amínoxidov, zmena štruktúry heterocyklického kruhu sa už tak výrazne neprejavovala. V sérii študovaných amínoxidov, obsahujúcich rovnaký alkyl (C_{12}) antimikróbna a cytolytická aktivita mierne vzrastali v poradí: 4-dodecylmorfolín-*N*-oxid, 1-dodecylpyrolidín-*N*-oxid, 1-dodecylpiperidín-*N*-oxid a 1-dodecylperhydroazepin-*N*-oxid.

Tieto výsledky jednoznačne dokazujú, že biologická aktivita testovaných amínoxidov závisí prevažne od dĺžky reťazca postranného alkylu, pričom ju iba mierne ovplyvňujú iné substituenty polarizovanej $N \rightarrow O$ skupiny.

Študované amínoxidy, ktorých biocídny efekt podmieňuje ich interakcia s biologickými membránami, majú veľa významných vlastností. Sú povrchovo aktívne, biodegradabilné, nekorozívne, rozpustné vo vode i nevodných rozpúšťadlách a pritom popri ich významnej antimikróbnej aktivite ich toxicita voči cicavcom je niekoľkonásobne nižšia ako toxicita odpovedajúcich kvartérnych amóniových solí. Tieto vlastnosti predurčujú študované amínoxidy na prípravu nových, vysokoúčinných sanitčných prostriedkov, ktoré by sa dali použiť i náročných podmienkach potravinárskeho priemyslu.

Rezistencia mikroorganizmov proti antimikróbnym látkam: Biochemický a genetický základ rezistencie kvasiniek proti mucidínu

Jedným z faktorov, v praxi negatívne ovplyvňujúcich efektívnosť antimikróbných látok, je rezistencia mikroorganizmov proti nim. V populácii mikroorganizmov vznikajú spontánnou alebo indukovanou mutačnou rýchlosťou rezistentné mutanty, ktoré v dôsledku špecifických zmien v štruktúre alebo obsahu bunkového genómu sú schopné tolerovať vyššie koncentrácie biocidných látok než pôvodná populácia mikroorganizmov.

Vzhľadom na to, že pri eukaryotických mikroorganizmoch (kvasinky, plesne) sú biochemické a genetické aspekty mikrobiálnej rezistencie preštudované oveľa menej ako pri prokaryotických baktériách, venovali sme sa štúdiu základných otázok rezistencie mikroorganizmov proti antifugálnym látkam. Biochemická a genetická analýza mikrobiálnej rezistencie si vyžaduje inhibítor o známom spôsobe účinku a mikroorganizmus s dobre preštudovanou genetikou a biochemickými vlastnosťami. Preto sa ako modelová antifungálna látka použil mucidín a ako mikroorganizmus kvasinka *S. cerevisiae*.

V priebehu štúdia sme zistili, že spontánna rezistencia proti mucidínu pri kvasinkách vzniká v pomerne nízkej frekvencii, ale ju ľahko možno zvýšiť rastom buniek za prítomnosti jednoduchých anorganických solí, ako je chlorid mangánatý. Na základe získaných výsledkov bolo možné izolované rezistentné kmene rozdeliť na tri odlišné skupiny. Mutanty prvej skupiny vykazovali združenú rezistenciu proti rozličným metabolickým inhibítorm, ale *in vitro* sa rezistencia nepozorovala. Mutanty druhej skupiny boli špecificky rezistentné proti mucidínu, pričom ukazujú rezistenciu i na subcelulárnej úrovni. Rezistencia pri týchto mutantoch bola výsledkom modifikácie väzbových alebo inhibičných miest inhibítora na mitochondriálnej membráne. Tretiu skupinu tvorili mutanty s vysokou rezistenciou proti mucidínu a so združenou rezistenciou proti rozličným iným inhibítorm na bunkovej úrovni, ale nie na subcelulárnej úrovni.

Genetickou analýzou sme zistili, že za rezistenciu proti mucidínu sú zodpovedné tak jadrové, ako aj mitochondriálne gény. V prípade mutantov prvej skupiny ide o jednogénovú jadrovú mutáciu recesívnej povahy, v prípade mutantov druhej skupiny o mutácie mimojadrových génov. Rezistencia pri mutantovi tretej skupiny bola determinovaná mutáciami oboch typov súčasne. Synergická interakcia týchto mutácií je zodpovedná za vysoký stupeň rezistencie proti študovanému antifungálnemu antibiotiku.

Pri mitochondriálnych mutantoch rezistencia proti mucidínu segregovala mitoticky a rezistentné determinanty sa stratili po indukcii petite mutantov s etídiom bromidom. Alelický test odhalil, že mitochondriálne mutácie vyvolávajúce rezistenciu proti mucidínu spadajú do dvoch geneticky nespojených miest mitochondriálneho genómu. Tieto miesta nie sú alelické s mitochondriálnymi miestami, ktoré podmieňujú rezistenciu proti chloramfenikolu, erytromycínu alebo oligomycínu.

Vzhľadom na naznačovanú existenciu dvoch mitochondriálnych génových produktov zúčastňujúcich sa na rezistencii kvasiniek proti mucidínu robili sa pokusy identifikácie odpovedajúcich mitochondriálnych translačných produk-

tov elektroforézou v polyakrylamidovom géle. Uvedenými metódami sa nenašli signifikantné rozdiely v elektroforetickom profile mitochondriálnych membrán, čo ukazuje, že mutáciami vyvolané zmeny v štruktúre odpovedajúcich polypeptidov predstavujúcich väzbové alebo inhibičné miesta mucidínu na membráne budú pomerne malé.

Uvedené výsledky biochemicko-genetickej analýzy mucidínovej rezistencie potvrdzujú, že ubiquinon:cytochróm c oxidoreduktáza je špecifickým miestom inhibičného účinku mucidínu. Minimálne dva polypeptidy nesúce jeho väzbové alebo inhibičné miesta na tomto enzýmovom komplexe sú syntetizované mitochondriami a kódované mitochondriálnou DNK. Extrachromozomálne mutácie lokalizované na tejto DNK sú takto zodpovedné za špecifické prejavy rezistencie húb proti tomuto antifungálnemu antibiotiku.

Metódy prípravy mucidín-rezistentných mikrobiálnych klonov i niektoré preštudované klony deponované v štátnej zbierke priemyselných produkčných mikroorganizmov sú predmetom patentovo-právnej ochrany.

Časť experimentálnych výsledkov získaných v priebehu riešenia tejto výskumnej úlohy bola už uverejnená [7—11] a ďalšie práce týkajúce sa uvedených výskumných okruhov sa pripravujú na publikovanie v príslušných vedeckých a odborných časopisoch.

Súhrn

Práca podáva súhrn výsledkov výskumu zameraného na štúdium biologickej aktivity chemicky syntetizovaných derivátov karbonylkyanidfenylhydrazónu, heterocyklických alkylaminoxidov a antifungálneho antibiotika mucidínu, vzhľadom na biochemický spôsob ich antimikróbného účinku a na biochemické a genetické pozadie mikrobiálnej rezistencie.

Literatúra

1. HUDEC, I. — STANKOVSKÝ, J. — SMIRNOV, V.: Hygiena a výživná hodnota potravín živočíšneho pôvodu. Bratislava, Príroda 1971.
2. REIMANN, H.: Food-borne Infections and Intoxications. New York, Acad. Press 1949.
3. HAMPL, B.: Potravinárska mikrobiológia. Praha, SNTL; Bratislava, Alfa 1948.
4. SMETANA, M.: Zborník referátov 2. vedeckej konferencie o akosti potravín. B. Bystrica 1976, s. 20.
5. NEUMANN, J.: V.: Současný stav potravinářského inženýrství. Brno 1976.
6. ŠUBÍK, J. — LEŠKOVÁ, Ž. — TAKÁČSOVÁ, G. — DUDÍKOVÁ, E.: Výskum biochemického účinku antimikróbných látok. Záverečná správa, Bratislava 1977.
7. GREKSÁK, M. — ŠUBÍK, J. — BAROŠKOVÁ, Ž. — GREKSÁKOVÁ, O.: Folia microbiol., 22, 1977, s. 386.
8. ŠUBÍK, J. — GREKSÁKOVÁ, O. — GREKSÁK, M. — TAKÁČSOVÁ, G.: Bulletin VÚP, XVI, 1977, č. 3, s. 1.
9. ŠUBÍK, J. — TAKÁČSOVÁ, G. — PŠENÁK, M. — DEVÍNSKÝ, F.: Antimicrob. Agent. Chemother., 12, 1977, s. 139.
10. ŠUBÍK, J.: V: Th. Bücher, W. Neupert, W. Sebald und S. Werner (Eds), Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria. Amsterdam, North-Holland 1976, s. 473.
11. ŠUBÍK, J. — KOVÁČOVÁ, V. — TAKÁČSOVÁ, G.: Eur. J. Biochem., 73, 1977, s. 275.

Прогресс в исследовании биохимического действия избранных противомикробных веществ и механизмов сопротивления микроорганизмов по отношению к ним

Выводы

В работе приводятся результаты исследования, направленного на изучение биологической активности химически синтезированных производных карбонилцианид-фенилгидразона, гетероциклических алкил-аминоокиселов и антифунгального антибиотика, муцидина, принимая во внимание биохимический способ их противомикробного действия и биохимическую и генетическую подоплеку микробного сопротивления.

Progress in the research of the biochemical effect of selected antimicrobial agents and of the mechanisms of microorganisms resistance to them

Summary

The paper presents the summary of the results of research directed to the study of the biological activity of chemically synthesized derivatives of carbonylcyanide phenylhydrazone, heterocyclic alkyl amine oxides and antifungal antibiotic mucidin with respect to biochemical mode of their antimicrobial action and biochemical and genetic background of microbial resistance.