

A *Xenorhabdus budapestensis* entomopatogén baktérium sejtmentes fermentlevének és tisztítottfehérje-frakciójának antimikrobiális hatása néhány zoonoticus baktériumra

Burgettiné dr. Böszörményi Erzsébet¹ ■ Barcs István dr.¹
Domján Gyula dr.¹ ■ Bélafiné dr. Bakó Katalin² ■ Fodor András dr.³
Makrai László dr.⁴ ■ Vozik Dávid²

¹Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar, Epidemiológia Tanszék, Budapest

²Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Veszprém

³Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, USA

⁴Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Járványtani Mikrobiológiai Tanszék, Budapest

Bevezetés: A folyamatosan megjelenő multirezisztens kórokozók és a bevetett új antibiotikumok között állandó „harc” folyik. A klinikumban és az állatgyógyászatban használt antibiotikumok jelentős része már nem hatékony. Eltérő hatásmechanizmusú antibakteriális peptidek alkalmazása alternatív megoldást jelenthet. A rovarpatogén *Xenorhabdus budapestensis* baktérium szintetizálni képes különböző antimikrobiális hatású fehérjekomponenseket (*bicornutin-A*, *fabclavin*). **Célkitűzés:** *Xenorhabdus budapestensis* antibakteriális hatásának mérése zoonózist okozó baktériumokon *in vitro*. **Módszer:** Gram-pozitív (*Rhodococcus equi*, *Erysipelothrix rhusiopathia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*) és Gram-negatív (*Salmonella gallinarum*, *Salmonella derby*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila*) tesztbaktériumokon sejtmentes fermentlé és a tisztítottfehérje-biopreparátum antibakteriális hatásának mérése agardiffúzióval véres agaron. **Eredmények:** A *Xenorhabdus budapestensis* fehérjéket termel, amelyek hígításaitól függően erős antibakteriális aktivitást fejtenek ki a tesztelt baktériumokon. A tisztított frakció hatása erősebb volt, mint a sejtmentes fermentlé. A Gram-pozitív baktériumok érzékenyebbek voltak. **Következtetések:** A *Xenorhabdus budapestensis* antimikrobiális hatású fehérjei hatékonyságot mutattak a zoonózist okozó baktériumokon, és potenciális esélyük lehet e szervezetek elleni bevetésre, illetve azok megelőzésében a jövőben. Orv. Hetil., 2015, 156(44), 1782–1786.

Kulcsszavak: *Xenorhabdus budapestensis*, fabclavin, bicornutin-A, zoonózis, antimikrobiális hatás

Xenorhabdus budapestensis entomopathogenic bacteria cell free conditioned medium and purified peptide fraction effect on some zoonotic bacteria

Introduction: Many multi-resistant pathogens appear continuously resulting in a permanent need for the development of novel antibiotics. A large number of antibiotics introduced in clinical and veterinary practices are not effective. Antibacterial peptides with unusual mode of action may represent a promising option against multi-resistant pathogens. The entomopathogenic *Xenorhabdus budapestensis* bacteria produce several different antimicrobial peptides compounds such as *bicornutin-A* and *fabclavin*. **Aim:** The aim of the authors was to evaluate the *in vitro* antibacterial effect of *Xenorhabdus budapestensis* using zoonotic pathogen bacteria. **Method:** Cell-free conditioned media and purified peptide fractions of *Xenorhabdus budapestensis* were tested on Gram-positive (*Rhodococcus equi*, *Erysipelothrix rhusiopathia*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative (*Salmonella gallinarum*, *Salmonella derby*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila*) test bacteria on blood agar. **Results:** *Xenorhabdus budapestensis* produces proteins, which show strong antibacterial activity against the tested bacteria. The purified fraction effect was stronger than the cell-free ferment. Gram-positive bacteria were more sensitive. **Conclusions:** *Xenorhabdus budapestensis* antimicrobial active proteins showed effectiveness against zoonotic pathogen bacteria, and they may be a promising option for their prevention in the future. Orv. Hetil., 2015, 156(44), 1782–1786.

nes) and Gram-negative bacteria (*Salmonella gallinarum*, *Salmonella derby*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Aeromonas hydrophila*) using agar diffusion test on blood agar plates. **Results:** It was found that *Xenorhabdus budapestensis* bacteria produced compounds with strong and dose-dependent effects on the tested organisms. Purified peptid fraction exerted a more marked effect than cell free conditioned media. Gram-positive bacteria were more sensitive to this antibacterial effect than Gram-negative bacteria. **Conclusions:** Antibacterial peptide compound from *Xenorhabdus budapestensis* exert marked antibacterial effect on zoonotic pathogen bacteria and they should be further evaluated in future for their potential use in the control or prevention of zoonoses.

Keywords: *Xenorhabdus budapestensis*, fabclavin, bicornutin-A, zoonosis, antimicrobial activity

Böszörményi, E., Barcs, I., Domján, Gy., Bakó, K., Fodor, A., Makrai, L., Vozik, D. [*Xenorhabdus budapestensis* entomopathogenic bacteria cell free conditioned medium and purified peptide fraction effect on some zoonotic bacteria]. Orv. Hetil., 2015, 156(44), 1782–1786.

(Beérkezett: 2015. július 30.; elfogadva: 2015. szeptember 2.)

Rövidítések

CFCM = sejtmentes fermentlé; HCL = hidrogén-klorid; LB = Luria-Broth tápleves folyadék; MBK = Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont; MeOH = metil-alkohol; MIC = minimális inhibitor-koncentráció; NH₄OH = ammónium-hidroxid; OD = optikai denzitás; OEK = Országos Epidemiológiai Központ; PF = tisztított biopreparátum-frakció; pH = pondus Hydrogenii, hidrogénion-kitevő; SZIE = Szent István Egyetem; XAMP = *Xenorhabdus* antimikrobiális hatású peptid

Az antimikrobiális peptidok iránti kereslet magyarázata a sokféle klinikai igény, többek között első helyen áll az új, egyre nagyobb gyakorisággal megjelenő poli- és multirezisztens baktériumok okozta kihívás. A *Xenorhabdus budapestensis* rovarpatogén nematodák bélcsövében élő Gram-negatív baktérium, amelynek anyagcseretermékei között antimikrobiális aktivitású peptidok találhatók [1], s bicornutin-A néven került leírásra. 2014-ben publikálták [2], hogy ez a fehérje nemcsak egy hexapeptidből áll, hanem egy egész hibridmolekulafehérje-család, amely a fabclavin elnevezést kapta. Bioszintéziséért egy géncuster felelős, amelyet molekuláris és bioinformatikai elemzéssel sikerült azonosítani.

Az antimikrobiális hatással rendelkező fehérje egyaránt hatékony volt előzetes kísérleteinkben növényi patogéneken (*Erwinia amylovora* [1]), valamint állat-egészségügyi szempontból jelentős a tehenek mastitisét kiváltó baktériumokon (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) *in vitro* kísérletekben [3, 4].

E tesztelésre kiválasztott baktériumtörzsek azért számítanak különlegesnek, mert nagy részüket nem tesztelték az említett peptiddel szemben. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Karán működő mikrobiológiai laboratóriumban végeztük. A tesztelésben szereplő sejtmentes fermentlé és a tisztított biopreparátum a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki Karán működő fermentációs laboratóriumban készült kooperációs munka keretében.

Módszer

A *Xenorhabdus budapestensis* DSM-16342^T EPB törzs XAMP-termelő primer variánsából készült el a sejtmentes fermentlé és a tisztított biopreparátum, amely a korábbi vizsgálatokban a legmagasabb antimikrobiális hatású anyag termelésére volt képes [5].

Az antimikrobiális hatású anyagot termelő baktériumot növesztettük LB-táplevesben, 25 °C hőmérsékleten rázatva (200 rpm) és 3 lépésben lépteket növelve. A stationer fázis elérését követően centrifugáltuk a sejt-kultúrákat (15 000 g, 20 °C, 20 perc), majd 0,22 µm pórusátmérőjű szűrővel (Merck Millipore) sejtmentesre szűrtük. Ebből készült a kísérletekhez a sejtmentes fermentlé. A sejtmentes kondicionált fermentléből (CFCM) 3 liter mennyiség további tisztításra került, és ebből készült el a tisztított peptidokban gazdag (PF) frakció, amelynek előkészítése a következő volt: Az előkészített oldatokat 48 órán keresztül ráztuk 150 rpm fordulaton 20 g/l – előzőleg desztillált vízben autokláv segítségével (121 °C, 30 perc) aktivált – Amberlite® XAD 1180^R kationcserélő gyantával, a bioaktív anyagok adszorbeálása érdekében. A gyanta mosása és az extrahálás ez után több lépésben, különböző töménységű metanololdatokkal történt, a következő sorrendben: 1 l steril desztillált víz, 500 ml 25%-os MeOH, 3×300 ml 50%-os MeOH, 3×300 ml 80%-os MeOH, végül 300 ml cc. MeOH, amit 3 ml 2 N HCl-dal savanyítottunk meg. A savas kémhatású, tömény metanolos frakciót – amely tartalmazza az antimikrobiális hatással rendelkező komponenseket – rotációs vákuumdesztilláció segítségével (35 °C) bepároltuk hozzávetőleg 50 ml térfogatra, majd 2 N NH₄OH-oldat segítségével közömbösítettük pH = 6 értékig. A neutralizált mintát ez után teljesen szárazra pároltuk, így nyertünk a folyamat végén 47,7 mg/ml száraz anyag-tartalmú anyagot, amelyet 10 ml desztillált vízben, hűtőszekrényben tároltunk steril csőben felhasználásig.

Az elkészített CFCM és PF anyagoknak (100%, 80%, 60%, 40%, 20%) különböző hígításaival végeztük a kísér-

1. táblázat | A tesztelt baktériumok antibiotikum-rezisztenciája néhány vizsgált antibiotikummal szemben

Tesztelt baktériumok	Néhány sajátosság	Antibiotikum-érzékenységi eredmények* (R: rezisztens, 0–15 mm közötti a gátlási zóna átmérője)	Törzsek forrása
<i>Rhodococcus equi</i>	Gr ⁺ coccus	AMC: R, AMX: R, CTX: R, IPM: R, QD: R, P: R, RA: R, S: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Erysipelothrix rhusiopathia</i>	Gr ⁺ coccus	AMC: R, AMX: R, CM: R, CTX: R, KM: R, RA: R, P: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gr ⁺ coccus	B: R, CFM: R, CIP: R, IPM: R, OX: R, QD: R, S: R, VA: R	OEK törzsgyűjtemény
<i>Streptococcus equi</i>	Gr ⁺ coccus	B: R, CFM: R, IPM: R, PB: R, S: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Gr ⁺ coccus	AMX: R, CTX: R, FT: R, IPM: R, KM: R, RA: R, S: R, QD: R, P: R, PB: R	OEK törzsgyűjtemény
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gr ⁺ coccus	CFM: R, CTX: R, CIP: R, FT: R, KM: R, S: R, P: R, PB: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Salmonella gallinarum</i>	Gr ⁻ pálca	AMC: R, AMX: R, CIP: R, CLR: R, CS: R, GM: R, IPM: R, MUP: R	OEK törzsgyűjtemény
<i>Salmonella derby</i>	Gr ⁻ pálca	AMC: R, AMX: R, CIP: R, CS: R, IPM: R, QD: R, P: R, RA: R	OEK törzsgyűjtemény
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Gr ⁻ pálca	CLR: R, CTX: R, CFM: R, FT: R, IPM: R, QD: R, P: R, S: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Escherichia coli</i> OF280	Gr ⁻ pálca	AMX: R, CM: R, E: R, KM: R, P: R, RA: R	Olasz F. (MBK) humán izolátum
<i>Pasteurella multocida</i>	Gr ⁻ pálca	AMX: R, P: R	Makrai L. (SZIE)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gr ⁻ pálca	AMC: R, DO: R, E: R, FT: R, MTR: R, P: R, TE: R	Makrai L. (SZIE)

*Antibiotikum-korongok rövidítése a gyártó által megjelöltek szerint: AMC = amoxicillin+clavulánsav, AMX = amoxicillin, B = bacitracin, CFM = cefixim, CIP = ciprofloxacín, CLR = clarithromycin, CM = clindamycin, CTX = cefotaxim, CS = colistin, DO = doxycyclin, E = erythromycin, FT = nitrofurantoin, GM = gentamycin, IPM = imipenem, KM = kanamycin, MTR = metronidazol, MUP = mupirocin, OX = oxacillin, P = penicillin, PB = polymixin, QD = quinupristin-dalfopristin, RA = rifampicin, S = streptomycin, TE = tetracyclin, VA = vancomycin.

leteinket véres agar lemezekon, agardiffúziós technikával, aerob körülmények között, mindhárom párhuzamos alkalmazásával [6]. A tisztított frakciók és hígításai az alábbi szárazanyag-koncentrációkat tartalmazták: 100% (0,47), 80% (0,38), 60% (0,28), 40% (0,19), 20% (0,095 µg/ml). Az OD-t minden egyes baktériumnál 0,5-re állítottuk be 0,5 McFarland-standarddal.

A patogén baktériumból 300 µl-t előzetesen 54 °C hőmérsékletű, 2,7 ml térfogatú lágy agarban szuszpendáltunk, majd egy hirtelen mozdulattal ráöntöttük a véres agar lemezre. 20' várakozás után a lágy agar megdermedt, és ezekbe készítettük steril lyukfúróval a 9 mm átmérőjű furatokat. A furatokba 100 µl CFCM és PF különböző hígításai kerültek. Beoltás után az agardiffúziós lemezeket 37 °C-os termosztátba helyeztük és a következő 48 órán belül sor került a gátlási zónák átmérőinek a mérésére. A mérőoldatokat és a hígítások elkészítését a Clinical and Laboratory Standards Institute által közölt makrohígítási módszerben leírtaknak megfelelően végeztük. A tesztelt baktériumok antibiotikum-érzékenységét papírdiffúziós korongtechnikával készítettük el a nemzetközi ajánlások betartása mellett Müller–Hinton-agarlemezekon [7]. A tesztelt baktériumok rezisztenciaeredményeit láthatjuk néhány vizsgált antibiotikummal szemben az 1. táblázatban.

Eredmények

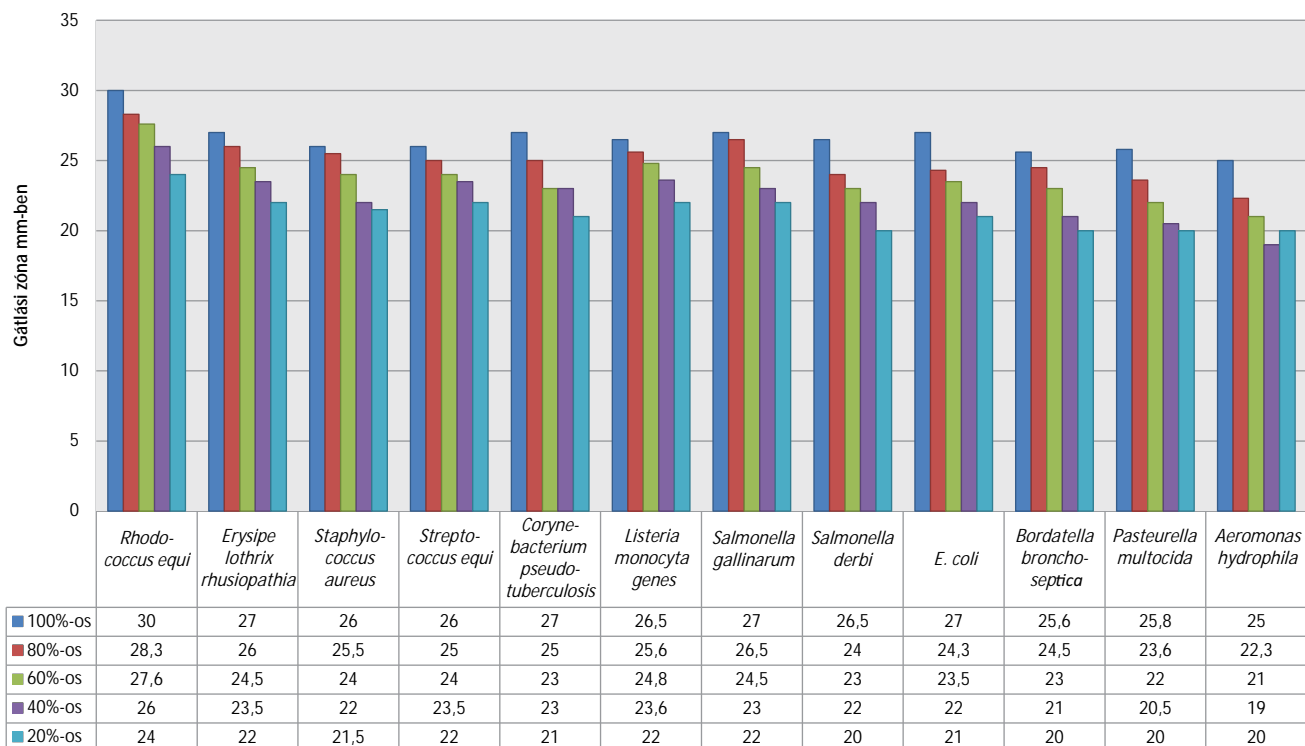
A *Xenorhabdus budapestensis* baktériumból készített sejtmentes fermentlé és a tisztított biopreparátum antimikrobiális hatást fejtett ki valamennyi, tesztelésben részt

vevő baktériumra agardiffúziós kísérleteinkben. A gátlási zónákat 48 órán belül mértük a véres agar lemezekon. A gátlási zónák nagysága a kezelést követő napon már kialakult és azok mérete nem változott. A peptid antimikrobiális hatását ezért „baktericidnek” feltételezzük. A furat körüli feltisztulást mm-ben mértük és hasonlítottuk össze a két kezelt anyagnál. A biopreparátum esetében 3–4 mm-nél nagyobb gátlási zónák alakultak ki átlagosan, így erőteljesebb antimikrobiális hatást fejtett ki ugyanazon hígításoknál (1. ábra), mint a sejtmentes fermentlé (2. ábra). Eredményeinkből látható, hogy a hígítások nagysága jelentős mértékben befolyásolta a gátlási zóna nagyságát.

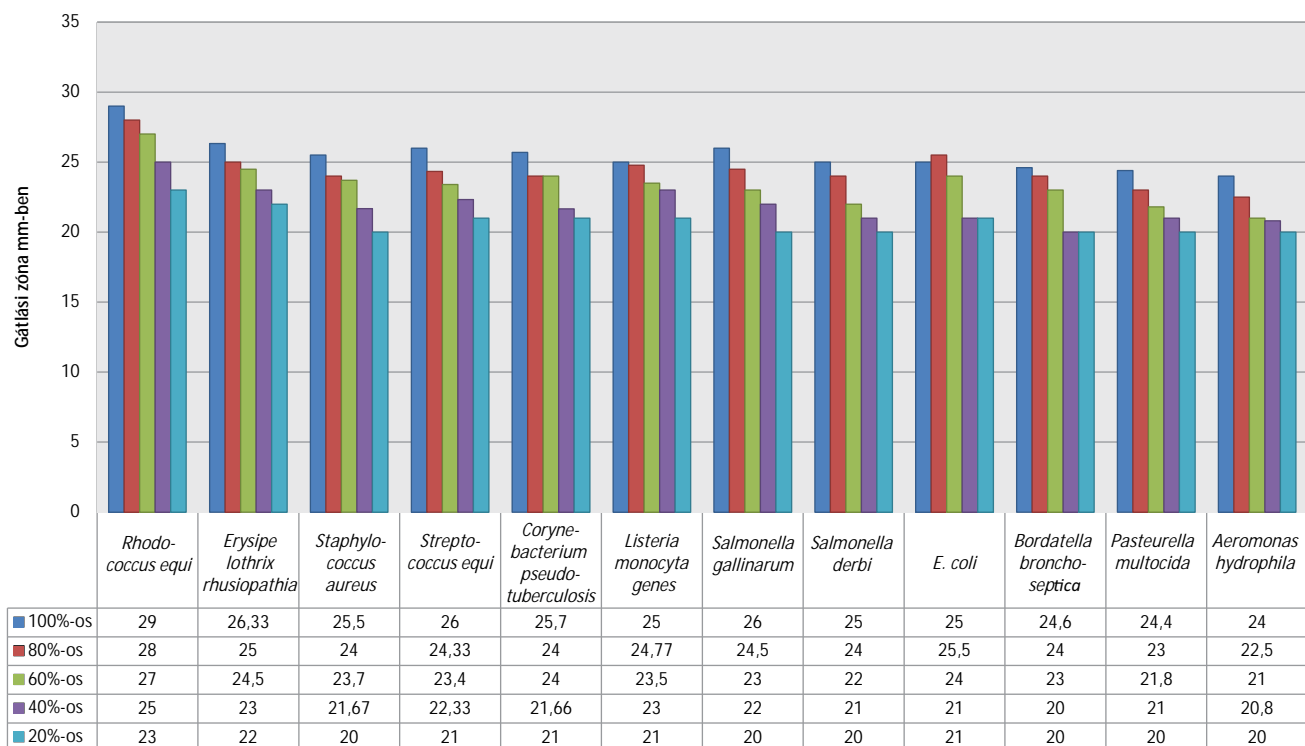
A Gram-pozitív baktériumok érzékenyebbek voltak, mint a Gram-negatív baktériumok, függetlenül attól, hogy azok milyen antibiotikum-érzékenységgel rendelkeztek. Vizsgálatainkban a legnagyobb érzékenységet a Gram-pozitív *Rhodococcus equi*, a legkisebb érzékenységet a Gram-negatív *Aeromonas hydrophila* érte el.

Megbeszélés

A *Xenorhabdus budapestensis* baktériumok sejtmentes fermentlévében (CFCM) és annak tisztított biopreparátumában (PF) antimikrobiális hatású (fabclavin, bicornutin-A) fehérjék találhatóak. Összehasonlítottuk 12, zoonózist okozó baktérium érzékenységét ezen fehérjékkel szemben. A tesztelt baktériumok jelentős része állat-egészségügyi járványokból származó izolált és azonosított baktériumtörzs volt.



1. ábra | A *Xenorhabdus budapestensis* PF tisztított fehérjékben gazdag frakciójának antimikrobiális hatása a tesztelt baktériumokon



2. ábra | *Xenorhabdus budapestensis* CFCM sejtmentes frakciójának antimikrobiális hatása a tesztelt baktériumokon

Előzetesen felmértük a baktériumtörzsek antibiotikum-érzékenységét. Összefüggést nem találtunk a XAMP-érzékenység és a különféle antibiotikumokkal szembeni rezisztencia között. Valamennyi vizsgált bakté-

rium érzékenységet mutatott. A tesztelt (CFCM, PF) anyagok 20%-os hígításai elérték a baktérium szaporodásának gátlásához szükséges MID-értéket. Eredményeink alapján látható, hogy a PF hatása erősebb volt a külön-

böző hígításoknál. A 20%-os hígítása „0,095 µg/ml hatóanyag-tartalom” mellett elérte a baktériumok szaporodásának gátlásához szükséges hatást, amelyet „baktericid”-nek feltételezünk.

Következtetések

Eredményeink megerősítik azt, hogy XAMP nemcsak a növényorvoslás [8] hasznos eszköze lehet, hanem arra is jó esély van, hogy az állatgyógyászatban és talán a humán klinikumban is a jövő antibiotikumává váljon, a szükséges vizsgálatokat követően [9]. Feltételezzük, hogy a peptid a sejtmembránt károsítja, „kilyukasztja” azt, így az a baktérium pusztulásához vezet. Eredményeink alapján a hibrid fehérje széles hatásspektrumú, amellyel szemben gyors rezisztenciakialakulás nem várható.

Az általunk felfedezett és korábban leírt *bicornutin-A* potenciális esélyeire utal, hogy a Helix BioMedix gyár az elmúlt 20 évben foglalkozik antimikrobiális hatással rendelkező peptidok kutatásával. Többek között hexapeptidsorokat állít elő, amelyet sikertült szabadalmaztatni abból a célból, hogy bakteriális és gombapatogének ellen alkalmazzák [10].

Anyagi támogatás: A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: A szerzők a kézirat megírásában egyenlő arányban vettek részt. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Böszörményi, E., Érsek, T., Fodor, A., et al.: Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. J. Appl. Microbiol., 2009, 107(3), 746–759.
- [2] Fuchs, S. W., Grundmann, F., Kurz, M., et al.: Fabclavines: bioactive peptide-polyketide-polyamino hybrids from *Xenorhabdus*. ChemBioChem., 2014, 15(4), 512–516.
- [3] Furgani, G., Böszörményi, E., Fodor, A., et al.: *Xenorhabdus* antibiotics: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria. J. Appl. Microbiol., 2008, 104(3), 745–758.
- [4] Fodor, A., Hevesi, M., Mathe-Fodor, A., et al.: Novel anti-microbial peptides of *Xenorhabdus* origin against multidrug resistant plant pathogens. In: Bobbarala, V. (ed.): Biochemistry, Genetics and Molecular Biology – A Search for Antibacterial Agents. In-Tech Academic Publisher, Rijeka, 2012, 148–196.
- [5] Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., et al.: Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 2005, 28(2), 115–122.
- [6] Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J.: Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. J. Antimicrob. Chemother., 2008, 61(6), 1295–1301.
- [7] CLSI 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2012.
- [8] Vozik, D., Böszörményi, E., Fodor, A., et al.: *Xenorhabdus budapestensis* entomopathogen bacteria purified fraction effect fire blight against. [*Xenorhabdus budapestensis* entomopathogen baktérium sejt kultúrájából nyert tisztított frakció hatásossága tűzelhalás ellen.] Georgikon Agricultur. AMJ Agricult. Sci., 2015, 19, 46–51. [Hungarian]
- [9] Böszörményi, E., Fodor, A., Hogan, J., et al.: Multi-drug resistant Gram-negative pathogens against protection by *Xenorhabdus* antimicrobial peptide used in vitro. [Multi-drog rezisztens Gram-negatív patogének elleni védekezés lehetősége *Xenorhabdus* antimikrobiális peptidok felhasználásával: in vitro kísérletek eredményei.] Georgikon Agricultur. AMJ Agricult. Sci., 2014, 19, 84–90. [Hungarian]
- [10] Falla, T. J., Zhang, L., Harris, S. M.: Antimicrobial hexapeptides. US Patent, 2008, 407(7), 940.

(Burgettiné dr. Böszörményi Erzsébet,
e-mail: boszormenyi@se-etk.hu)