

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ
ԱԿԱԴԵՄԻԱ

«ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԻՏԱԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ

ԲԱՐԱՅԱՆ ԲԵԼԼԱ ԳԱԳԻԿԻ

PSEUDOMONAS, *STENOTROPHOMONAS*, *XANTHOMONAS* ՑԵՂԵՐԻ ՈՐՈՇ
ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՄԱՆՐԷՆԵՐԻ ԲԱԶՄԱԿԱՅՈՒՆՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ ԵՎ
ԴՐԱ ՀԱՂԹԱՀԱՐՈՒՄԸ L-ԳԻՆԵԹԹՎԻ ՍԻՆԹԵՏԻԿ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐՈՎ

Գ.00.07 - «Մանրէաբանություն, կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի հայցման
ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2023

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТРА «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ»

БАБАЯН БЕЛЛА ГАГИКОВНА

ИЗУЧЕНИЕ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ

РОДОВ *PSEUDOMONAS*, *STENOTROPHOMONAS*, *XANTHOMONAS* И ЕЕ

ПРЕОДОЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПРОИЗВОДНЫМИ L-ВИННОЙ КИСЛОТЫ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.07 – «Микробиология, биотехнология».

ЕРЕВАН - 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» գիտաարտադրական կենտրոնի (ԳԱԿ-ի) գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.թ. Նելլի Ալեքսանդրի Հովհաննիսյան

**Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., դոցենտ Հովիկ Հարությունի Փանոսյան
Կ.գ.թ. Հայկանուշ Օնիկի Քոլոյան**

**Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտ**

**Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023թ. դեկտեմբերի 22-ին
ժամը 15⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈԿ-ի
Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:**

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան 14, հեռ./ֆաքս՝ +374 10) 65 41 80:

**Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա»
ԳԱԿ-ի գրադարանում:**

Սեղմագիրն առաքված է 2023թ. նոյեմբերի 22-ին:

**018 մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար՝ Կ.գ.թ.**

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Научный руководитель: к.б.н. Оганесян Нелли Александровна

Официальные оппоненты: д.б.н., доцент Паносян Овик Арутюнович
к.б.н. Коляян Айкануш Ониковна

Ведущая организация: Институт Молекулярной Биологии НАН РА

Защита диссертации состоится 22 декабря 2023 г., в 15⁰⁰ часов, на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056 РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел./факс: (+374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НППЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 22 ноября 2023 г.

Ученый секретарь специализированного
совета 018 к.б.н.

Аветисова Г. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Повсеместное и быстрое распространение мультирезистентных патогенов («супербактерий») является одной из важнейших проблем здравоохранения и сельского хозяйства в свете повышения частоты летальных исходов мультирезистентных инфекций, по причине неэффективности антибиотикотерапии.

Представители родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* входят в число наиболее опасных мультирезистентных патогенов человека, животных и растений. Они распространены повсеместно (включая арктические льды, пещеры, пустыни), колонизируя любые влажные поверхности, природного и антропогенного происхождения. На ряду с высокой адаптивностью, для патогенных представителей указанных родов характерны резистентность к токсичным ксенобиотикам и большой биодеградационный потенциал, в то время как непатогенные представители – широко применимы, в качестве богатого источника различных биоактивных соединений и агентов биоконтроля вредителей. Мобильные генетические элементы, встречающиеся в геноме представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, определяют значительную роль этих микроорганизмов в распространении генов резистентности среди грамотрицательных бактерий в природных и клинических условиях, с формированием новых стабильных штаммов патогенов, толерантных к антибиотикотерапии. В этой связи, первоначально важно изучение резистентности бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, и путей ее преодоления.

Одним из приоритетных подходов к решению проблемы мультирезистентности является диверсификация природных, экологически безопасных антимикробных соединений, преимущественно растительного происхождения, таких как алдаровые кислоты и, в частности, природной или L-винной кислоты (ВК или L-ВК), весьма распространенной в растительном организме.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является изучение резистентности у природных штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* к АБ, а также антимикробного действия новых синтетических производных ВК против мультирезистентных бактерий. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить резистентность природных штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas*, депонированных в «Центре Депонирования Микроорганизмов» (МДС), Научно-производственного Центра (НПЦ) «Армбиотехнология» Национальной Академии Наук Республики Армения (НАН РА) к различным классам АБ.

- Осуществить скрининг генов, определяющих резистентность исследуемых бактерий к различным классам АБ. Исследовать их плазмидный состав и определить локализацию генов резистентности к АБ в геноме исследуемых бактерий.

- Изучить внутривидовой и межродовой горизонтальный перенос генов резистентности к АБ различных классов мобильными генетическими элементами (плазмидами).

- Выявить наличие экстрацеллюлярных полифенолоксидаз и липаз у исследуемых бактерий; изучить степень их влияния на стабильность резистентности к АБ в неселективных условиях.

- Исследовать антимикробное действие 6-ти новых синтетических производных ВК (бензилимида, циклогексилимида, фенилимида, бензил-, циклогексил-, фенил-комплексных аминокислот ВК) в отношении бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas in vitro*.

- Изучить возможность распространения резистентности к новым производным ВК мобильными генетическими элементами (передачи резистентности при помощи плазмид).

- Осуществить докинг-анализ с целью выявления механизмов воздействия новых производных ВК на рост мультирезистентных бактерий, используя модели белков-мишеней *Pseudomonas* и других условно-патогенных микроорганизмов *in silico*.

- Изучить процесс биодegradации новых производных ВК штаммами почвенных бактерий группы *Pseudomonas chlororaphis in vitro*.

Научная новизна.

1) В данной работе впервые изучена мультирезистентность 210 природных штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* (10 видов, 6 подвидов) к 13 АБ, широко применимым в медицине и сельском хозяйстве. Изучены различные факторы, обуславливающие резистентность указанных бактерий к антимикробным препаратам, стабильность резистентности и пути ее распространения, а также роль биодegradационных свойств указанных бактерий в поддержании стабильности их резистентности к АБ.

2) *In vitro* и *in silico* методами впервые изучено биологическое действие 6-ти новых синтетических производных (бензилимида, циклогексилимида, фенилимида, бензил-, циклогексил-, фенил-комплексных аминокислот) ВК на штаммы представителей родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* и других грамотрицательных бактерий.

Изучена возможность передачи резистентности к указанным соединениям у грамотрицательных бактерий.

3) Впервые *in vitro* изучена биодegradуемость синтетических производных (бензилимида, циклогексилимида, фенилимида, бензил-, циклогексил-, фенил-комплексных аминокислот) ВК штаммами почвенных бактерий группы *P. chlororaphis*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты изучения свойств 6-ти новых производных ВК с улучшенными антимикробными свойствами, могут служить предпосылкой для разработки новых антимикробных препаратов, предназначенных для борьбы против мультирезистентных патогенов, с потенциальным применением в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и других отраслях народного хозяйства.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Из изученных 210 штаммов природных, почвенных бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* большинство обладают стабильной резистентностью к АБ.

- У исследованных бактерий, свойство резистентности к АБ, передается путем межвидового горизонтального переноса генов, осуществляемого плазмидами.

- Стабильность и передаваемость резистентности к АБ не связана с генами экстрацеллюлярных полифенолоксидаз, а у некоторых штаммов связана с генами экстрацеллюлярных липаз.

- Новые синтетические производные природной ВК (бензил-, циклогексил- и фенил- имида и комплексные аминокислоты L-ВК) обладают антимикробным действием в отношении мультирезистентных фитопатогенных и условно-патогенных штаммов изучаемых бактерий.

- Непатогенные представители изученных бактерий резистентны к указанным новым производным ВК и данное свойство не передается плазмидами.

- Описанные новые производные L-ВК могут быть биодegradированы непатогенными представителями изучаемых бактерий.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена в рамках тематического финансирования Комитета по науке Министерства образования, науки, культуры и спорта РА № 18Т-2I036 «Генетическое изучение плазмид штаммов рода *Pseudomonas*, резистентных к АБ» (2018 – 2020 гг.), базового финансирования «Изучение генов, обуславливающих резистентность к АБ у штаммов бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, выделенных из почвы» (2020 – 2021 гг.), а также в рамках проекта-поддержки для аспирантов и соискателей EIF (Enterprises Incubator Foundation) & PMI (Philip Morris International) Science «Новые биодegradирующие производные натуральной

ВК, как эффективные агенты для борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами: применение в сельском хозяйстве и пищевой промышленности»

(2020 – 2021 гг.), грантовой программы ANSEF (Armenian National Science & Education Fund) #microbio-5133 «Генетическое исследование плазмид у антибиотикорезистентных Pseudomonas» (2019 – 2020 гг.).

Личный вклад соискателя. Соискателю, под руководством научного руководителя, заведующей лабораторией экологической безопасности, к.б.н. Оганесян Н. А., принадлежит решающая роль в выборе направлений исследований, формулировании проблемы, постановке целей и задач, разработке экспериментальных подходов и выборе методик, анализе и обобщении полученных результатов. Соискателем лично принято участие на всех этапах исследований. В процессе работы над диссертацией, помимо научного руководителя, дополнительная консультативная помощь соискателю оказана: заведующим отделом получения агрохимикатов и контроля качества Национального Аграрного Университета Армении (НАУА), к.х.н., доцентом А. Р. Микаеляном. Участие коллег в исследованиях отражено в совместных публикациях.

В работах, выполненных в соавторстве, соискателем принято участие при выполнении экспериментальной работы, обобщении и интерпретации полученных результатов, подготовке научных публикаций и представлении результатов в форме научных докладов. Права соавторов публикаций не нарушены.

Апробация работы. Результаты исследований неоднократно доложены на заседаниях Ученого совета ИПЦ «Армбиотехнология» НАН РА, а также на 24-х республиканских и международных конференциях.

В частности: “2nd International Conference on Advanced Research in Science, Engineering, and Technology (ICARSET), Sorbonne University, Paris, France”, 26-28 марта 2021г.; “2nd International Scientific and Practical Internet Conference: “Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates”, Dnipro, Ukraine”, 4-5 февраля 2021г.; “III International Scientific and Practical Conference "Modern Science: Problems and Innovations", Stockholm, Sweden, 1-3 июня 2020г.; “Applied Research International Conference on Pure & Applied Sciences” (ARICPAS), Cambridge University, Cambridge, UK, 17-19 ноября 2019г.; “2nd International Conference on Research in Science, Engineering & Technology”, Oxford University, Oxford, UK, 8-10 ноября, 2019г.; “2nd Annual Congress on Microbiology and Microbiologists and 6th International Conference on Mycology and Fungal Infections”, Madrid, Spain, 2-8 октября 2019г.; “4th International Conference on Medicine and Natural Sciences” (ICMN IV), 26-27 апреля 2019г.; “Regional Workshop: Alternative Approaches To Combatting Anti-Microbial Resistance”, NIAID, NIH, U.S. HHS, RPCMV, Ministry of Education and Science, Kazakhstan, 18-19 апреля 2019г.; “10th South Eastern European Immunology School of European Federation of Immunological Societies & EUROIMMUN European Journal of Immunology”, EFIS-EJ SEEIS 2018, Ереван, РА, 19-22 октября 2018г., а также на международных и республиканских конференциях в РА: International Scientific and Practical Conference “Biotechnology: Science And Practice, Innovation And Business”, Ереван, 20-22 октября 2021г.; Годичные научные конференции Национального Политехнического Университета Армении (НПУА) 2018г., 2019г., 2020г., 2021г.; Международная, 14-ая Годичная и Студенческая конференции РАУ, 2019г., 2020г., 2021г.; Международная конференция Ереванского Государственного Университета (ЕГУ) “Современные тенденции в биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и значение его исследований”, Ереван, 11-13 ноября 2019г.; “International Conference “Caves As Natural & Cultural Monuments”, НАН РА, Ереван, 11-13 сентября 2019г.; Юбилейная Конференция Ширакского Государственного Университета, Гюмри, 8-9 ноября 2019г.; “Current State of Pharmacy & Prospects of its Development” 1st International Conference, ЕГУ, Ереван, 1-3 ноября 2018г.; “The 19th Congress of the European Section of the International Society of Toxinology”, EU-IST 2018, Ереван, 22-26 сентября 2018г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 статьи и 12 тезисов.

Место выполнения работы. Работа выполнена в Лаборатории экологической безопасности ИПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из «введения», «обзора литературы», «экспериментальной части», включающей «материалы и методы», «результаты исследований и их обсуждение», «заклучения», «выводов» и «списка литературы», включающего 192 наименования. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, содержит 55 рисунков и 34 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Литературный обзор посвящен обобщению имеющихся данных литературы о различных классах антибиотиков (АБ), о механизмах антибиотикорезистентности, ее стабильности и распространения у различных патогенных и непатогенных бактерий, представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*.

Изложены литературные данные о разнообразии ферментов и кодирующих их генов, определяющих различные типы антибиотикорезистентности у различных видов бактерий. Приведены литературные данные о наиболее распространенных представителях природных альдаровых кислот и их производных, а также о применении данных соединений в качестве антимикробных агентов.

Проведено обобщение литературных данных об экстрацеллюлярных липазах и полифенолоксидазах, вовлеченных в процессы биодegradации ксенобиотиков, характерные для многих представителей бактерий изучаемых родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas*. Рассмотрена их потенциальная связь со стабильностью антибиотикорезистентности у различных видов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в рамках тематического финансирования Министерства Образования, Науки, Культуры и Спортa РА № 18Т-21036 «Генетическое изучение плазмид штаммов рода *Pseudomonas*, устойчивых к антибиотикам» (2018 – 2020 гг.); гранта ANSEF #microbio-5133 «Генетическое исследование плазмид у антибиотикорезистентных *Pseudomonas*» (2019 – 2020 гг.); базового финансирования «Изучение генов, обуславливающих резистентность к АБ у штаммов бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, выделенных из почвы» (2020 – 2021 гг.); стипендиального проекта для аспирантов и соискателей EIF & PMI Science «Новые биодegradирующие производные природной ВК, как эффективные агенты для борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами: применение в сельском хозяйстве и пищевой промышленности» (2020 – 2021 гг.).

Объект исследования. Штаммы 210 изучаемых бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* были предоставлены ИЦМ ИПЦ «Армбиотехнология» НАН РА. Новые производные ВК – фенил-, бензил-, циклогексил-имиды и комплексные аминокислоты были синтезированы в базовой научно-исследовательской лаборатории «Получение сельскохозяйственных ядохимикатов и контроль качества» НПУА.

Изучение антибиотикорезистентности и ее стабильности. Резистентность бактерий изучали к 13 АБ в их протокольных концентрациях, а также в концентрациях 25 мкг/мл, 30 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 500 мкг/мл. Гены резистентности и потенциал их передаваемости изучали методами агарозного гель-электрофореза DNA, PCR и трансформации методом Мандела. Качественное определение экстрацеллюлярных липаз и полифенолоксидаз проводили с использованием полисорбатов, тирозина, таннина, α -нафтола на твердой культивационной среде. Горизонтальный перенос генов соответствующих ферментов изучали методом трансформации.

Изучение действия новых производных природной ВК. Антимикробное (бактерицидное и бактериостатическое) действие шести имидов и комплексных солей ВК

(рис. 4.) изучали *in vitro*, методом посева на селективных средах с различными концентрациями тестируемых соединений. Анализ механизма действия проводили *in silico*, методом молекулярного докинга. Потенциал передаваемости резистентности к новым производным ВК изучали *in vitro* методом трансформации. Биodeградируемость новых производных ВК непатогенными почвенными бактериями группы *P. chlororaphis* изучали *in vitro*, методом замены источника углерода в культивационной среде.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программ Microsoft Excel 10.0 и Grapher-7 для персонального компьютера.

Рассчитывали средние арифметические ($X_{cp.}$) стандартные отклонения (s), ошибки средней арифметической (m), достоверность различий выборочных средних с помощью парного t-критерия (α), коэффициенты детерминации (R^2).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

У изученных почвенных штаммов бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*, наблюдается вариабельность спектра резистентности к 13 АБ различных групп и поколений (ампициллин, пенициллин, амоксициллин, аугментин, цефиксим, цефтриаксон, хлорамфеникол, канамицин, гентамицин, стрептомицин, тетрациклин, ципрофлоксацин, азитромицин). Среди них преобладают устойчивость к клавулановой кислоте, пан-резистентность и мультирезистентность, обусловленная наличием генов модификации АБ и эффлюкс систем, кодируемых у различных штаммов, как нуклеоидом, так и плазмидами.

Обнаруженные у изучаемых бактерий, плазмиды способны к стабильной репликации в неселективных условиях, а у некоторых штаммов, плазмиды содержат больше одного гена модификации АБ.

Обнаружены также и штаммы, с более чем одним типом плазмид, независимо передающих различные гены резистентности. Плазмиды всех изученных *P. taetrolens* не передают резистентности к 13 изученным АБ.

У некоторых штаммов обнаружены гены клинических патогенов: *catB7* на нуклеоиде и *blaOXA-10*, *aac(6')II*, *aph(3')IV* на нуклеоиде и на плазмидах. У некоторых штаммов выявлены различные мутации, приводящие как к снижению, так и к повышению резистентности: мутантный ген *blaOXA-10* (*P. fluorescens* 9070, *P. fluorescens* 9075, *P. putida* 9249), резистентный к клавулановой кислоте и мутантный ген *aac(6')II*, не обеспечивающий резистентность к канамицину (*P. putida* 9249) (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1.

Резистентность почвенных MDC *P. aeruginosa* к АБ.

Штамм	Резистентность к АБ													С
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
5249a	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	-	R	+
9056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5249b	R	-	-	R	R	R	R	R	R*	R	R	R	R*	+
9057	-	R	-	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	+
9058	-	-	-	R	-	R	R	-	-	-	R	R	-	+
9059	R	-	-	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	+

1 – канамицин, 2 – стрептомицин, 3 – гентамицин, 4 – хлорамфеникол, 5 – аугментин, 6 – амоксициллин, 7 – ампициллин, 8 – пенициллин, 9 – цефиксим, 10 – цефтриаксон, 11 – тетрациклин, 12 – азитромицин, 13 – ципрофлоксацин, С – контроль на полноценной среде, “R” – резистентность, “-” – чувствительность к АБ; “R*” – бактериостатическое действие, “+” – рост штамма на полноценной среде (контроль).

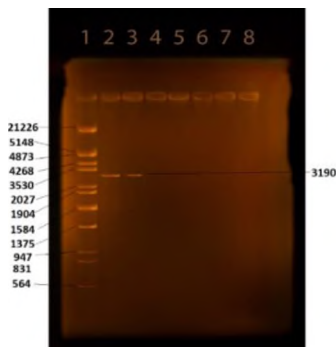


Рис. 1. PCR анализ гена *catB7* (3190bp) различных штаммов *P. aeruginosa*.

1 – маркерная смесь фрагментов DNA, 2 – MDC *P. aeruginosa* 9059, 3 – MDC *P. aeruginosa* 5249a, 4 – MDC *P. aeruginosa* 5249b, 5 – MDC *P. aeruginosa* 9057, 6 – MDC *P. aeruginosa* 9058, 7 – MDC *P. aeruginosa* 9056, 8 – MDC *P. aeruginosa* 9057.

Для понимания причин стабильности плазмид резистентности, было определено наличие экстрацеллюлярных биодеградационных ферментов: липаз и полифенолоксидаз тирозиназы и лакказы. Полифенолоксидазы обнаружены в основном у непатогенных представителей видов *P. chlororaphis*, *P. taetrolens*, а также некоторых видов *P. fluorescens* и *S. maltophilia*. Согласно отрицательным результатам, полученным при экспериментах по трансформации штаммов, не проявивших полифенолоксидазную активность плазмидами штаммов, проявивших таковую, гены всех обнаруженных полифенолоксидаз имеют нуклеотидную локализацию. Таким образом, можно прийти к заключению о том, что обнаруженные экстрацеллюлярные тирозиназа и лакказа не связаны с плазмидами, обуславливающими резистентность к АБ. Также следует отметить, что в изученной группе штаммов, экстрацеллюлярная полифенолоксидазная активность была более распространена у непатогенных штаммов представителей группы *P. chlororaphis* (*P. chlororaphis*, *subsp. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *subsp. chlororaphis*, *P. chlororaphis*, *subsp. aurantiaca*, *P. taetrolens*), а также у некоторых штаммов *S. maltophilia* (рис. 2).

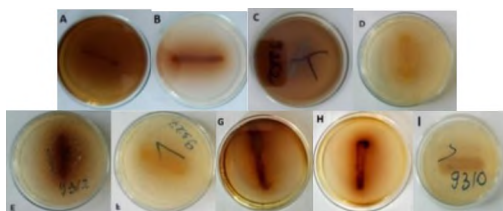


Рис. 2. Качественное определение экстрацеллюлярных полифенолоксидаз *Pseudomonas*.

А – лакказа MDC *P. geniculata* 9335; С – лакказа MDC *P. putida*, var. *melanogenes* 9252; D – тирозиназа MDC *P. geniculata* 9336; E – тирозиназа MDC *Pseudomonas* sp. 9312; F – тирозиназа MDC *Pseudomonas* sp. 9327; G – тирозиназа MDC *S. maltophilia* 9288; H – тирозиназа MDC *S. maltophilia* 9302; I – тирозиназа MDC *S. maltophilia* 9310.

Это также подтверждает предположение о том, что экстрацеллюлярные полифенолоксидазы не несут особого вклада в поддержании стабильности и в распространении резистентности к АБ у условно-патогенных представителей изученных бактерий. Согласно полученным данным, экстрацеллюлярные липазы были обнаружены

не во всех изученных штаммах представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* (рис. 3).

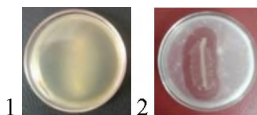


Рис. 3. Качественное определение экстрацеллюлярных липаз.

1 – MDC *S. maltophilia* 9288 (Твин 85); 2 – MDC *P. chlororaphis*, *subsp. chlororaphis* 9168 (Твин 20);

Обнаруженные экстрацеллюлярные липазы отличались по своей субстратной специфичности, что проявлялось в их способности к разложению различных типов полисорбатов, отличающихся по длине углеродной цепи жирной кислоты в их составе. Были обнаружены ферменты, способные к разложению полисорбатов как с короткой, так и с длинной углеродной цепью соответствующей жирной кислоты, а также способные к одновременной деградации полисорбатов Твин-20, Твин-40, Твин-60, Твин-65, Твин-80 и Твин-58. Согласно данным трансформации, гены обнаруженных липаз с различной субстратной специфичностью обнаружены как на нуклеоиде, так и на плаزمиде изученных штаммов бактерий, вне зависимости от их видовой принадлежности. У некоторых штаммов изученных бактерий, экстрацеллюлярные липазы представлены не одним, а несколькими генами, часть из которых кодируется нуклеоидом. Так, у штамма *S. maltophilia* 9288 обнаружена плазмидная липаза, разлагающая полисорбаты Твин 20, Твин 40, Твин 60, Твин 65, Твин 80, Твин 85, а у *S. maltophilia* 9277 обнаружено несколько типов липаз с различной субстратной специфичностью, кодируемых плазмидами. Согласно полученным результатам экспериментов по трансформации, плазмиды, передающие гены обнаруженных липаз, не способны к стабильной репликации в реципиентах штаммах трех изученных родов бактерий в неселективных условиях.

Таким образом, биodeградационные свойства изученных бактерий, определяемые как экстрацеллюлярными полифенолоксидазами, так и экстрацеллюлярными липазами не имеют значительного вклада в стабильность плазмид, определяющих мультирезистентность к АБ (табл. 2).

Таблица 2.

Изучение горизонтального переноса генов липаз MDC *S. maltophilia*.

Штамм-донор	P1	P2						C ⁺	C ⁻	St.
		20	40	60	65	80	85			
<i>S. maltophilia</i> 9285	80	-	-	-	-	+		+	-	0
<i>S. maltophilia</i> 9304	40, 60, 85	-	+	+	-	-	+	+	-	0
<i>S. maltophilia</i> 9302	40	-	+	-	-	+	-	+	-	0
	80	-	+	-	-	+	-	+	-	0
<i>S. maltophilia</i> 9288	20, 40, 60, 65, 80, 85	+	+	+	+	+	+	+	-	0
<i>S. maltophilia</i> 9277	20	+	-	-	-	-	-	+	-	0
	60	-	-	+	+	-	-	+	-	0
	80	-	-	-	-	+	-	+	-	0

“C⁺” – позитивный контроль на полноценной среде, “C⁻” – негативный контроль на минеральной среде, без источника углерода; “+” – рост трансформанта, “-” – отсутствие роста; P1 – полисорбат I рекультивации на минеральной среде с субстратом: Твин 20, Твин 40, Твин 60, Твин 80, Твин 85; P2 – полисорбат II рекультивации трансформанта; St. – стабильность трансформации (%); реципиенты: MDC *P. chlororaphis*, *subsp. chlororaphis* 9171, MDC *X. vesicatoria* 8850, MDC *Pseudomonas* sp. 9267.

Изучение воздействия новых, синтетических, азотсодержащих производных природной ВК на различные штаммы бактерий родов *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Stenotrophomonas* показало их антимикробные свойства. Согласно полученным данным, бензил-, циклогексил- и фенил-замещенные комплексные аминокислоты и имиды ВК демонстрируют значительную антибактериальную активность, проявляя бактериостатическое и бактерицидное действие, как в отношении резистентных к АБ, так и в отношении чувствительных, штаммов бактерий, условно-патогенных для человека и животных, а также в отношении фитопатогенных представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* (рис. 4).

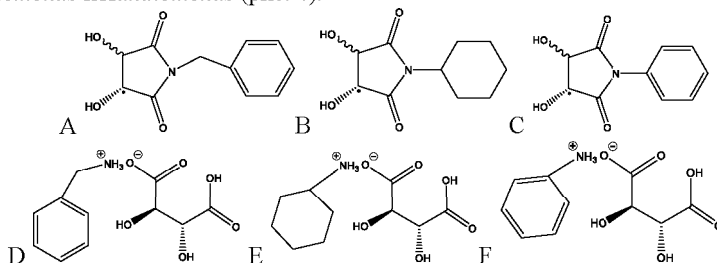


Рис. 4. Новые производные природной ВК.

А – бензилиמיד ВК, В1 (1-benzyl-3,4-dihydroxy-313-pyrrolidine-2,5-dione), M = 220,20; В – циклогексилиמיד ВК, С1 (1-cyclohexyl-3,4-dihydroxy-313-pyrrolidine-2,5-dione), M = 212,23; С – фенилиמיד ВК, PhI (3,4-dihydroxy-1-phenyl-313-pyrrolidine-2,5-dione), M = 206,18; D – бензиламино соль ВК, ВAS (phenylmethanaminium (2R,3R)-3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoate), M = 257,24; E – циклогексиламино соль ВК, CAS (cyclohexanaminium (2R,3R)-3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoate), M = 249,26; F – фениламино соль ВК, PhAS (benzenaminium (2R,3R)-3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoate), M = 243,22.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) изученных новых производных ВК различны и варьируют, в зависимости от штамма и вида изучаемой бактерии, а также различий функциональных групп в соответствующем производном (табл. 3).

Таблица 3.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) новых производных L-ВК при действии на условно-патогенные и фитопатогенные штаммы различных представителей родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*.

Вещество	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК)			
	<i>P. syringae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>X. beticola</i>	<i>S. maltophilia</i>
В1	6,6 мкг/мл	66 нг/мл	66 нг/мл	50 мкг/мл
ВAS	7,68 мкг/мл	76 нг/мл	76 нг/мл	768 мкг/мл
CAS	7,47 мкг/мл	7,47 мкг/мл	7,47 мкг/мл	747 мкг/мл
С1	3,18 мкг/мл	31,8 нг/мл	31,8 нг/мл	50 мкг/мл
PhI	50 мкг/мл	6,18 мкг/мл	6,18 мкг/мл	618 мкг/мл
PhAS	50 мкг/мл	7,29 мкг/мл	7,29 мкг/мл	729 мкг/мл

С1 – циклогексилиמיד ВК, В1 – бензилиמיד ВК, ВAS – бензил аминокислота ВК, CAS – циклогексил аминокислота ВК, PhAS – фенил аминокислота ВК, PhI – фенилиמיד ВК.

МИК фенил-производных для всех изученных штаммов бактерий были значительно выше, по сравнению со значениями для бензил- и циклогексил-производных ВК. В жидкой среде подавление роста штамма *P. aeruginosa* 5249b в случае циклогексилимида ВК составляет 52%, в случае циклогексиламино комплексной соли – 48%, в случае бензилимида – 41%, а в случае бензиламино комплексной соли – 21%. Циклогексил- и

бензил-производные ВК проявляют значительное антимикробное действие в отношении *P. syringae pathovar lachrymans* 8742, а также других штаммов фитопатогенов *P. syringae*, *pv. tabaci*, *P. syringae*, *pv. syringae*, *P. syringae*, *pv. lachrymans*, *X. vesicatoria*, *X. beticola*. При этом, подавление роста штамма *P. syringae pv. lachrymans* 8742 составляет 63% в случае бензиламино комплексной соли ВК, 67% – в случае бензилимида, 75% – в случае циклогексиламино комплексной соли и 83% – в случае циклогексилимида (рис. 5).

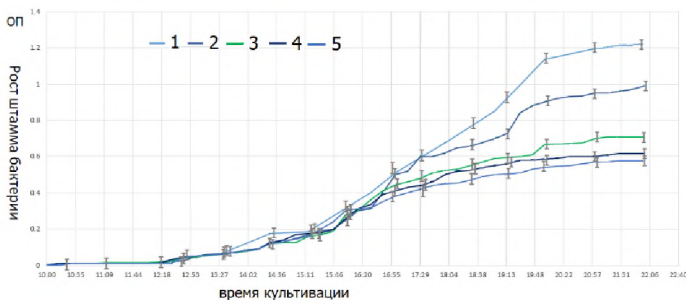


Рис. 5. Подавление роста *P. aeruginosa* 5249b новыми производными L-ВК в жидкой среде.

1 – рост на полноценной среде; тестируемые соединения в концентрации в 10 раз ниже МИК: 2 – BAS, 3 – BI, 4 – CAS, 5 – CI ($p < 0$; SEM=±0,23-0,37)

Изучение действия фенил-, бензил- и циклогексил-производных ВК на различных фитопатогенах *Xanthomonas* и *Pseudomonas* показало, наибольший подавляющий эффект бензил- и циклогексил-производных ВК, в то время как фенил-производные ВК оказывают менее выраженное антимикробное действие (рис. 6).

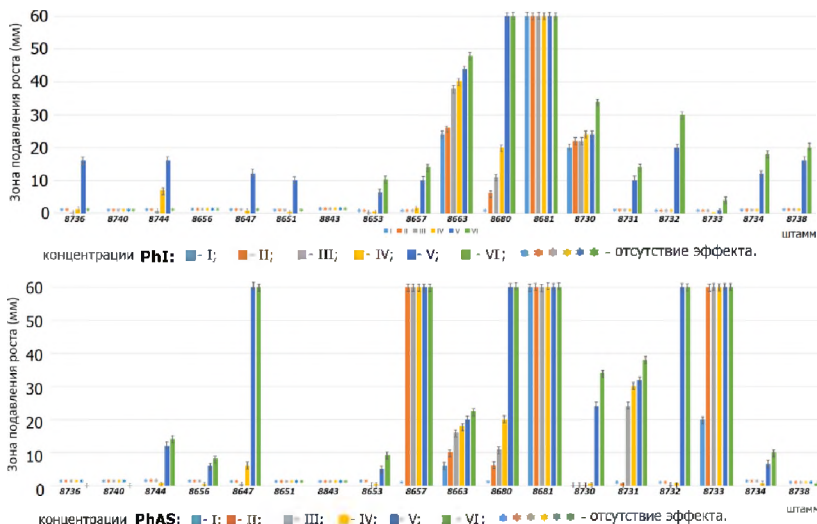


Рис. 6. Действие фенил-производных ВК на рост фитопатогенных представителей родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*.

Концентрации PhAS (фенил- комплексной аминокислоты ВК) и PhI (фенилимида ВК): I – 0,001M, II – 0,01M, III – 0,025M, IV – 0,05M, V – 0,1M, VI – 0,5M; “*” – отсутствие эффекта (Значения зон подавления роста представлены в мм, усредненные как результат 15 независимых экспериментов, $p < 0$).

Фенил-производные демонстрируют преимущественно бактериостатическое действие, как в форме комплексной соли, так и в виде имида, в то время как циклогексил- и бензил-замещенные производные демонстрируют бактерицидный эффект. Аналогичное было отмечено и для условно-патогенных представителей изучаемых родов бактерий. Циклогексил- и бензил-производные ВК, как в форме имидов, так и в форме комплексных аминокислот, более активны в отношении большинства изученных штаммов различных видов *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. geniculata*, условных патогенов человека и животных, а также фитопатогенов *P. syringae*, *pv. lachrymans*, *P. syringae*, *pv. tabaci*, *X. vesicatoria*, *X. beticola* оказывают, в основном, бактерицидное действие (рис. 7).

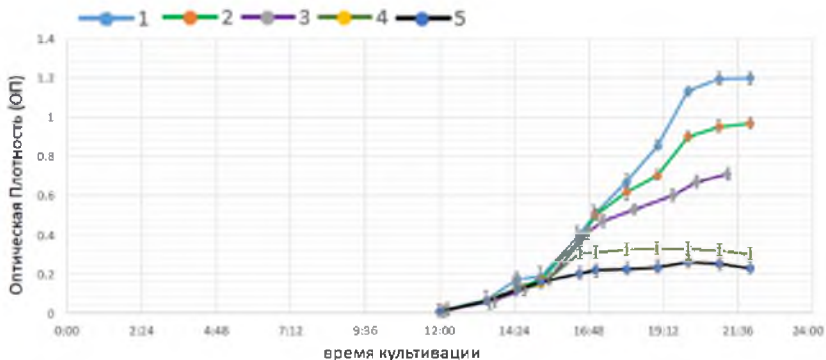


Рис. 7. Подавление роста *MDC P. syringae* *pv. lachrymans* 8742 новыми производными L-ВК в жидкой среде.

1 – позитивный контроль на полноценной среде; тестируемые соединения в концентрации в 10 раз ниже МИК: 2 – BAS, 3 – BI, 4 – CAS, 5 – CI. ($p < 0$, SEM=±0,23-0,37)

Резистентность к новым производным ВК проявляют в основном представители непатогенных почвенных представителей группы *P. chlororaphis* (*P. chlororaphis*, *subsp. chlororaphis*, *P. chlororaphis*, *subsp. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *subsp. aurantiaca*, *P. taetrolens*), демонстрирующие широкий спектр полифенолоксидазной активности. Таким образом, на основе полученных данных можно прийти к выводу, что наблюдается определенная селективность антибактериального воздействия новых производных ВК. Все описанные соединения не подавляют рост изученных штаммов *P. chlororaphis*, большинства изученных штаммов *P. fluorescens* и *E. coli* DH5a в концентрациях до 0,05M. Резистентность к данным соединениям не обусловлена плазмидами и не передается путем межвидового горизонтального переноса генов. Это затрудняет потенциальное приобретение и распространение резистентности бактерий к данным соединениям.

Некоторые непатогенные штаммы, резистентные к новым производным ВК, способны к их биодegradации, утилизируя данные соединения в качестве источника углерода. Бензил- и фенил-комплексные аминокислоты ВК биодegradируют большим числом штаммов, чем циклогексиламино комплексная соль ВК. Все штаммы, для которых описана биодegradация комплексных аминокислот ВК, обладают ярко выраженной полифенолоксидазной активностью, являясь преимущественно представителями *P. chlororaphis*, *P. taetrolens* и *P. fluorescens*. Вероятно, этим и обусловлены биодegradационные свойства данных штаммов. Имидные производные, не подвергаясь биодegradации изучаемыми бактериями, все же не могут считаться высокостабильными ксенобиотиками почвы, в следствие их возможности дegradации путем кислотного или щелочного гидролиза под действием химических агентов почвы, а также биодegradируются другими микроорганизмами почвы, описанными в литературе.

Таким образом можно судить об относительной потенциальной экологической безопасности описанных соединений. Согласно полученным данным, свойства биodeградации бензил-, циклогексил- и фенил-комплексных аминокислот ВК не передаются плазмидами. Это же характерно и для полифенолоксидаз, обнаруженных у всех штаммов биodeградирующих комплексные аминокислоты ВК. Это, вероятно, может служить причиной непередаваемости генов биodeградации новых производных ВК путем межвидового горизонтального переноса (табл. 4.).

Таблица 4.

Биodeградация новых производных ВК (0,5М) бактериями группы *P. chlororaphis*

Штамм	BAS	CAS	C+	C-	Штамм	BAS	CAS	C+	C-
9189	+	-	+	-	9163	-	-	+	-
9171	+	-	+	-	9157	-	+	+	-
9190	+	-	+	-	9178	-	-	+	-
9159	-	-	+	-	9172	-	-	+	-
9177	+	+	+	-	9168	-	-	+	-
9174	-	-	+	-	9164	-	-	+	-
9158	-	-	+	-	9165	+*	-	+	-
9195	+	+	+	-	9066	+	-	+	-
9200	-	-	+	-	9062	+	+	+	-
9199	-	-	+	-	9064	-	+	+	-
9197	-	-	+	-	9061	-	-	+	-

BAS – бензиламино комплексная соль ВК, CAS – циклогексиламино комплексная соль ВК; 1 – *P. chlororaphis subsp. chlororaphis*, 2 – *P. chlororaphis, subsp. aureofaciens*, 3 – *P. chlororaphis, subsp. aurantiaca*; “+” – рост бактерий, “-” – отсутствие роста, * – рост отдельных колоний, “C+” – позитивный контроль на полноценной среде, “C-” – негативный контроль на минеральной среде без источника углерода.

Полевые испытания применения бензилимида ВК в качестве кормовой добавки для рыб показали эффективность и безопасность их использования. В ходе проведенных исследований не отмечено мутагенных и тератогенных свойств данных соединений на озерных животных. У микроорганизмов, подвергшихся действию данных соединений, не выявлено выраженного мутагенного эффекта.

Согласно результатам *in silico* и *in vitro* экспериментов, механизм активности данных соединений не связан с кислотностью ВК, а обусловлен действием функциональных групп в составе производных ВК (рис. 8-9, табл. 5).

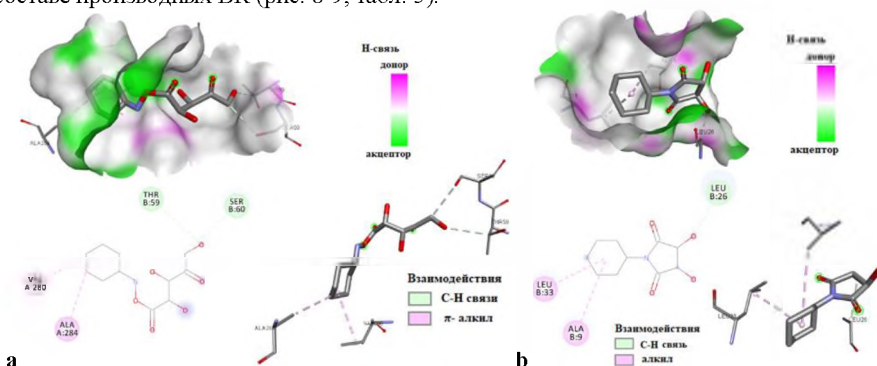


Рис. 8. Докинг-анализ взаимодействия циклогексиламино комплексной соли ВК (а) и циклогексилимида ВК (б) с белком OXYR (1169).

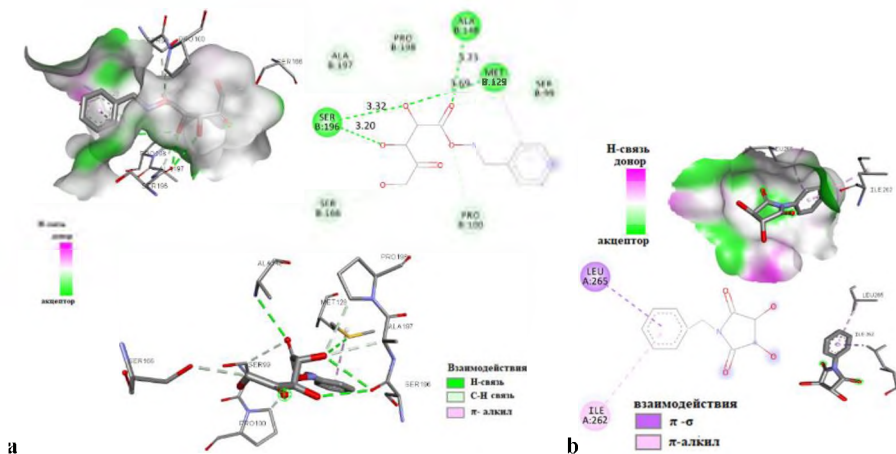


Рис. 9. Докинг-анализ взаимодействия бензилимида ВК (а) и бензиламино комплексной соли ВК (б) с белком TsarR (3FXQ).

Вероятно, механизм воздействия изучаемых новых синтетических производных ВК обусловлен связыванием циклических и ароматических функциональных групп имида и комплексных аминокислот ВК с аминокислотами в составе определенных сигнальных молекул мембран бактерий, а также факторов транскрипции определенных белков, таких как белки формирующие биофильм (рис. 10)

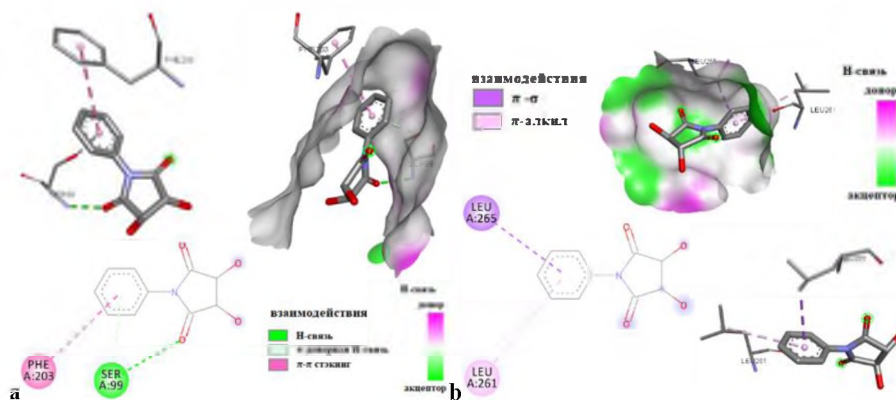


Рис. 10. Докинг-анализ взаимодействия фенилимида ВК с белками BenM (а) и TsarR (б).

Об этом свидетельствуют данные молекулярного докинга изучаемых бензилциклогексил- и фенил-замещенных производных ВК с тремя ключевыми белками-мишенями TsarR, BenM и OXYR, ответственными за различные стадии в проявлении свойств патогенности вирулентности *Pseudomonas* и других грамотрицательных микроорганизмов (табл. 5).

Таблица 5.

Энергия связывания новых синтетических производных ВК и комплексообразования с белками-мишенями бактерий.

Имиды и соли ВК	Лиганды								
	OXYR (PDB ID: 1i69)			BenM (PDB ID: 2f78)			TsaR (PDB ID: 3fxq)		
	B	ΔG	K_b	B	ΔG	K_b	B	ΔG	K_b
VI	+	-6.63 ± 0.33	6.84×10^4	+	-6.99 ± 0.34	1.24×10^5	+	5.40 ± 0.27	8.63×10^3
CI	+	-6.31 ± 0.32	4.00×10^4	+	-6.31 ± 0.32	4.00×10^4	+	-5.62 ± 0.28	1.25×10^4
PhI	-	-	-	+	-6.84 ± 0.34	9.74×10^4	+	-6.30 ± 0.31	3.91×10^4
Benz- Pcn	+	-7.25 ± 0.36	1.92×10^5	-	-	-	+	-6.30 ± 0.31	3.91×10^4
Fep	+	-7.50 ± 0.37	2.93×10^5	+	-8.50 ± 0.42	1.57×10^6	+	-6.35 ± 0.31	4.25×10^4
Vpr	+	-8.18 ± 0.40	9.22×10^5	+	-8.18 ± 0.40	9.22×10^5	+	-6.90 ± 0.34	1.07×10^5

B – связывание, K_b – константа связывания, ΔG – энергия связей, “+” – взаимодействие, “-” – отсутствие взаимодействия, VI – бензилид ВК, CI – циклогексилид ВК, PhI – фенилид ВК; Benz-Pcn – бензилпенициллин, Fep – цефепим, Vpr – цефтобипрол.

Результаты молекулярного докинга синтетических производных ВК так же подтверждают больший антимикробный эффект бензил-, циклогексил- и фенилзамещенных комплексных аминокислот и имидов ВК, как следствие большего сродства их циклогексил-, бензил- и фенил-групп к определенным структурам в составе белков-мишеней.

Согласно полученным данным, взаимодействия новых производных ВК с моделями важнейших белков: TsaR (регулятор транскрипции *P. testosteronei*), BenM (бензоатный эффектор связывания, регулирующий процессы формирования биопленки, при кворум-

сенсинге у *P. aeruginosa*), OxyR (сенсор пероксида водорода у *E. coli*) и с мишенями β -лактамных АБ различных поколений у грамотрицательных бактерий – разнообразны и включают гидрофобные взаимодействия алкильных групп аминокислот, водородные связи и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Эти взаимодействия осуществляются по специфическим остаткам аминокислот в составе молекул белка-мишени. В результате взаимодействия происходит специфическое связывание функциональной группы соответствующего производного ВК с карманоподобной структурой белка-мишени (рис. 11-12).

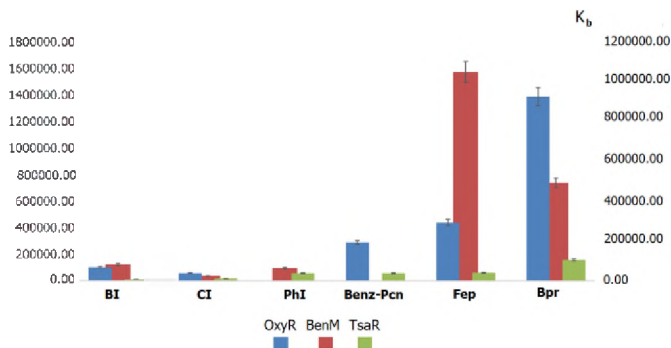


Рис. 11. Сравнение констант связывания новых производных ВК и β -лактамных АБ различных поколений с белками резистентности: TsaR (*P. testosteroni*), BenM (*P. aeruginosa*) и OxyR (*E. coli*).

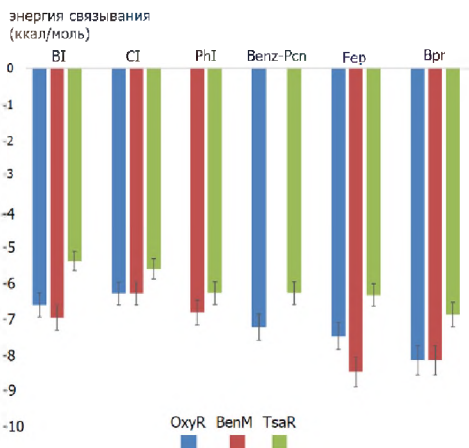


Рис. 12. Энергия связывания и комплексообразования новых производных ВК и β -лактамных АБ различных поколений с белками: TsaR (*P. testosteroni*), BenM (*P. aeruginosa*), OxyR (*E. coli*).

Согласно полученным данным, связывание с белком OxyR происходит в основном по радикалам дикарбоновых аминокислот, в то время как взаимодействие с белком BenM осуществляется по радикалам диаминомонокрбоновых аминокислот.

Таким образом, согласно результатам *in silico* исследования, описанные соединения могут быть эффективны против патогенов, формирующих биофильм, на стадии его формирования, блокируя биосинтез белковых компонентов.

ВЫВОДЫ

1. Резистентность к АБ встречается у большинства изученных бактерий родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas*. Она стабильна, проявляется в основном в мультирезистентности к 13-ти широко применимым АБ, являясь результатом экспрессии генов нуклеоида и передающихся плазмидами генов, вне зависимости от видовой принадлежности штамма. Резистентные штаммы депонированы задолго до клинического применения этих АБ, что свидетельствует об универсальности эффлюкс-механизма мультирезистентности этих штаммов. Плазмиды резистентности стабильны в штаммах указанных родов и нестабильны в *E. coli*, что свидетельствует о специфических особенностях нуклеоидной регуляции репликации этих плазмид.

2. В штаммах различных видов обнаружены экстрацеллюлярные липазы, отличающиеся по субстратной специфичности, кодируемые генами нуклеоида и плазмид. У штаммов группы *P. chlororaphis* и некоторых штаммов *S. maltophilia*, *P. geniculata* выявлены экстрацеллюлярные полифенолоксидазы, гены которых не передаются плазмидами.

3. Гены резистентности *aph(3')IV*, *aac(6')II*, *blaOXA-10* и *catB7*, характерные для клинических патогенов родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*, обнаружены на плазмидах и на нуклеоиде различных штаммов. Среди них выявлены: мутация резистентности к клавулановой кислоте в гене *blaOXA-10*; мутация снижения активности β-лактамазы в гене *blaOXA-10*; мутация инактивации аминогликозид N-ацетилтрансферазы в гене *aac(6')II*.

4. Синтетические производные – имиды и комплексные соли ВК: циклогексил- и бензил-комплексные аминосоли, а также циклогексимирид и бензилирид ВК оказывают бактерицидное действие на мультирезистентные штаммы, а фенил-комплексная аминосоль и фенилирид ВК оказывают бактериостатическое действие на условно-патогенные и фитопатогенные штаммы. МИК циклогексимирида при действии на *P. aeruginosa*, *X. beticola* составляют 31,8 нг/мг и 50 мкг/мл, при действии на *S. maltophilia*, демонстрируя наибольшую антибактериальную активность, в то время как при действии фенил-комплексной аминосоли ВК на *S. maltophilia* МИК составляет 729 мкг/мл, а в случае бензиламино комплексной соли ВК – 768 мкг/мл. Это позволяет рассматривать данные соединения в качестве перспективной альтернативы АБ в борьбе с мультирезистентными патогенами.

5. Бактерии группы *P. chlororaphis* и большинство изученных штаммов *P. fluorescens* резистентны к новым производным ВК. Одной из причин резистентности является присутствие полифенолоксидаз, разлагающих функциональные группы комплексных аминосолей ВК. Резистентность к ним не переносится плазмидами, что замедляет ее распространение и приобретение другими бактериями.

6. Фенил-, бензил- и циклогексил-комплексные аминосоли ВК биodeградируются бактериями группы *P. chlororaphis*, что говорит о потенциальной экологической безопасности их применения. Это свойство не передается плазмидами.

7. Механизм антимикробного действия новых синтетических производных ВК, согласно докин-анализу, основан на взаимодействии функциональных групп гидрофобными, Ван-дер-Ваальсовыми, электростатическими и водородными связями со специфическими положениями аминокислотных остатков в макромолекулах рецепторных белков мембраны и регуляторов транскрипции белков биофильма. Сайты связывания отличаются от таковых при взаимодействии с β-лактамами АБ, что предполагает альтернативный механизм действия данных соединений.

Список опубликованных работ

1. Mikaelyan A. R., Babayan B. G., Vartanyan A. A., Tokmajyan H. V. Tartaric acid synthetic derivatives effect on phytopathogenic bacteria // Agronomy Research 20(3), 644–659, 2022, doi.org/10.15159/AR.22.036. **Scopus Q3**
2. Мелкумян М. А., **Бабаян Б. Г.**, Микаелян А. Р. Сравнение антимикробного действия энтомопатогена *Brevibacillus laterosporus* и новых производных винной

- кислоты против фитопатогенных бактерий // Национальный Политехнический Университет Армении, ВЕСТНИК, Сборник научных статей, часть II, 2022, Ереван, РА, с. 614-618.
3. **Babayan B. G.** Bacterial Multi-Drug Resistance Combating by Tartaric Acid New Derivatives // Proceedings of VIII International Scientific and Practical Conference "Results of modern scientific research and development", Madrid, Spain 17-19 October 2021, p. 18-25.
 4. **Babayan B. G.**, Mikaelyan A. R., Asatryan N. L., Melkumyan M. A., Bagdasaryan S. A., Grigoryan A. M. Tartaric Acid New Synthetic Derivatives Antibacterial Activity against the Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* // Proceedings of the 2nd International Conference on Advanced Research in Science, Engineering, and Technology, 2021, Paris, France Mar. 26-28, 2021, p. 1-7. doi.org/10.33422/2nd.icarset.2021.03.120.
 5. Багдасарян А. Б., **Бабаян Б. Г.**, Унабян Л.С., Григорян А.М., Микаелян А.Р. Сравнительный анализ оценки антибактериальной активности иминов и аминокислот винной кислоты, методом молекулярного докинга // 2nd International Scientific and Practical Internet Conference "Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Winter Debates" / WayScience/ Biological Sciences, Dnipro, Ukraine – 2021, с. 156-164.
 6. **Babayan B. G.** Soil *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* Multi-Drug Resistance and Fighting Against Them by New Derivatives of Tartaric Acid // Bulletin of High Technology 3(17)/2021, Agriculture, Stepanakert, RA, p. 3-13.
 7. Melkumyan M., **Babayan B.**, Hovhannisyan N., Kinosyan M., Davidyant T., Mikaelyan G. The role of *Pseudomonas* enzymes of xenobiotics biodegradation in multi-drug resistance maintenance and transmission processes // International Scientific and Practical Conference "Biotechnology: Science and Practice, Innovation and Business" Articles, Oct 20-22, part II, Yerevan, 2021 RA, p. 91-94.
 8. Согомонян Т. М., Микаелян А. Р., **Бабаян Б.Г.**, Мелкумян М.А., Григорян А.М., Дапчян Н. А., Мелян Г. Г., Оганесян Н. А. Воздействие фенил- и моноэтаноламино замещенных иминов и комплексных солей винной кислоты на фитопатогенные бактерии // Национальный Политехнический Университет Армении, ВЕСТНИК, Сборник научных статей, часть I, 2021, с. 220-224.
 9. **Babayan B.G.**, Bagdasaryan S.A., Kinosyan M.H., Melkumyan M.A., Hovhannisyan N.A., Metabolic and Genetical Features of Biodegradation and Resistance Potential of Soil *Pseudomonas sp.* From the National Culture Collection of Microorganisms, RA // European Journal of Biomedical & Life Sciences. No 1, 2020, p. 12-19.
 10. **Babayan B.G.**, Mikaelyan A.R., Asatryan N.L., Bagdasaryan S.A., Melkumyan M.A. The Effect of Tartaric Acid New Derivatives Against the Multidrug Resistant Opportunistic Pathogenic Soil Strains of *Pseudomonas fluorescens* // Test Engineering and Management 83 (March - April 2020), page No. 8516 – 8521. **Scopus (March-April 2020, Q4)**
 11. **Babayan B.** Antibiotic Resistance and Xenobiotic Biodegradation Correlation in Native Soil *Pseudomonas chlororaphis* Group // The European Journal of Technical and Natural Sciences № 2 2020/ Section 1: Biology, p. 3-11.
 12. **Babayan B.**, Mikaelyan A., Asatryan N., Soghomonyan T., Baghdasaryan A., Melkumyan M., Bagdasaryan S., Grigoryan A. Tartaric Acid Synthetic Derivatives for Multi-Drug Resistant Phytopathogen *Pseudomonas* and *Xanthomonas* Combating // International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) (2020) Volume 52, No 1, p. 21-30.
 13. **Babayan B.**, Melkumyan M., Bagdasaryan S., Mikaelyan A. *Pseudomonas syringe* Growth Inhibition by Tartaric Acid New Derivatives // Abstracts of III International

- Scientific and Practical Conference" Modern Science: Problems and Innovations" June 1-3, 2020 / Biological Sciences, Stockholm, Sweden, p. 24-29.
14. Bagdasaryan S., **Babayan B.**, Melkumyan M., Kinosyan M. Polysorbates Biodegradation Potential and Plasmid Stability of Soil *Pseudomonas* // Austrian Journal of technical and natural sciences Scientific Journal No 5-6 (May-June)/ Section 1: Biology, Vienna 2020, p. 3-7.
 15. **Бабаян Б. Г.**, Багдасарян С. А., Мелкумян М. А., Микаелян А. Р. Антифитопатогенное действие синтетических производных винной кислоты // European Journal of Technical and Natural Sciences № 3 2020/ Section 1: Biology, Vienna 2020, с. 3-6.
 16. **Бабаян Б. Г.**, Багдасарян С. А., Мелкумян М. А., Саргсян А.С., Микаелян Г.С. Изучение стабильности и распространения мультирезистентности среди почвенных штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* // Четырнадцатая годовичная научная конференция, РАУ, 2-6 Дек, 2019, Сборник статей, Ереван, 2020, с. 132-140.
 17. **Babayan B. G.**, Mikaelyan A. R., Asatryan N. L., Bagdasaryan S. A., Melkumyan M. A., The Effect of Tartaric Acid New Derivatives Against the Multidrug Resistant Opportunistic Pathogenic Soil Strains of *Pseudomonas fluorescens* // Proceedings of The 2nd International Conference on Research in Science, Engineering and Technology, 8-10 Nov, 2019, Oxford, UK, p. 1-9.
 18. **Babayan B. G.**, Hovhannisyan N. A., Hovhannisyan A. M., Sargsyan A. S., Davidyan T.S., Resistance To β -Lactam Antibiotics in Some Soil *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* // The scientific heritage No 34 (2019) P.2 / Biological Sciences, Budapest, Hungary, p. 32-38.
 19. **Babayan B.**, The Plasmid Differences In Multi-Drug Resistant Opportunistic Pathogenic Soil Strains of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* // Proceeding of “4th International Conference on Medical and Natural Sciences”, Proceedings Book, Amsterdam, Netherlands, Apr. 26-27, 2019, p. 5-9.
 20. **Babayan B** Multiple Antibiotic Resistance of Soil Strains of *Pseudomonas chlororaphis* // European science review, No 5-6, (May-June), Section 1. Biology, Vienna, 2019, p. 3-8.
 21. Агец В. Ю., Микаелян А. Р., Кошак Ж. В., **Б. Г. Бабаян**, Дегтярик С. М. Современные тенденции в разработке эффективных комбикормов для рыб // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. 2019. Т. 57. № 3. С. 323–333, DOI10.29235/1817-7204-2019-57-3-323-333. **Web of Science (Scopus Q4)**
 22. Delegan Y., Sargsyan A., Hovhannisyan N., **Babayan B.**, Petrikov K., Vainstein M. Analysis of Genome Sequence and Trehalose Lipid Production Peculiarities of the Thermotolerant *Gordonia* Strain // Journal of Basic Microbiology, Epub 2019 Nov 7 (J Basic Microbiol. 2019; 1–7.), 2020, 60(1):14-21, <https://doi.org/10.1002/jobm.201900439>. **Web of Science (Scopus Q2)**
 23. Микаелян А. Р., **Бабаян Б. Г.**, Асатрян Н. Л., Согомонян Т.М., Караджян С.К., Багдасарян А.С., Мелкумян М.А., Назаретян А.Х. Действие винной кислоты, ее натуральных и синтетических производных на рост антибиотикорезистентных бактерий рода *Pseudomonas* и других почвенных непатогенных и условно-патогенных микроорганизмов // Национальный Политехнический Университет Армении, ВЕСТНИК, Сборник научных статей, часть II, 2019, Ереван, РА, стр. 696-701.
 24. **Babayan B. G.**, Sargsyan A.S., Bagdasaryan S.A., Melkumyan M.A. Multi-Drug Resistance in Native *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* of Soil // M. Nalbandyan State University of Shirak, Scientific Proceedings, No 2, Issue A, Natural Sciences, Gyumri, 2019, 141-148.

25. **Babayan B. G.**, Mikaelyan A. R., Grigoryan A. M., Asatryan N. L., Melkumyan M. A., Hovhannisyan N.A. New Classes of Tartaric Acid Derivatives as Prospective Tools for Antimicrobial Resistance Combating // V International Conference of Biotechnology and Health, Book of Abstracts, RAU, Yerevan, RA, October 29–31, 2020, p. 33-34.
26. **Babayan B. G.**, Hovhannisyan N. A., Melkumyan M. A., Sargsyan A. Inactivation of *Macrovipera lebetina obtusa* snake venom by enzymes of multidrug resistant *Pseudomonas* // Abstracts / Toxicon, Volume 159(2019) S1-S32, Page S20, Supplement 1, 5 March 2019, Part of Special Issue: EU-IST 2018, P-024, DOI10.1016/j.toxicon.2018.11.383. **Web of Science (Scopus Q3)**
27. **Babayan B. G.**, Sargsyan A. S., Bagdasaryan S. A., Melkumyan M. A., Hovhannisyan A. M., Hovhannisyan N.A. Antibiotic Resistance Genes of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* Isolated from Soil // Regional Workshop: Alternative Approaches to Combatting Anti-Microbial Resistance, Almaty, Kazakhstan, April 18-19, 2019, p. 32-33.
28. **Babayan B. G.**, Soghomonyan T.M., Mikaelyan A.R., Asatryan N.L. Antimicrobial Effect of Tartaric Acid New Derivatives on Antibiotic Resistant Bacteria // Regional Workshop: Alternative Approaches to Combatting Anti-Microbial Resistance, Almaty, Kazakhstan, April 18-19, 2019, p. 33.
29. **Babayan B. G.**, Mikaelyan A. R., Shahinyan S. M., Bagdasaryan S. A. Tartaric Acid New Derivatives Effect Against the Soil *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* as A Model for Research of Cave Infections Bacteria Antibiotic Resistance Combating // "Caves as Natural And Cultural Monuments", International Conference, Program and Abstracts, Yerevan, RA, September. 11-13, 2019, p. 22-23.
30. **Babayan B.**, Hovhannisyan N., Hovhannisyan A., Sargsyan A., Kinoyan M., Davidyant T., S. Bagdasaryan, Melkumyan M., Oganeyzova G. The Research of Aminoglycoside Resistance Spread in Non-Pathogenic Strains of *Pseudomonas* Isolated From Soil // Book of Abstracts of "Current State of Pharmacy & Prospects of its Development" 1st International Conference, YSU, November 01-03, 2018, p. 18.
31. **Бабаян Б.**, Согомонян Т., Микаелян А., Асатрян Н., Багдасарян А., Багдасарян С., Варданян А., Мелян Г. Антимикробная активность и биодegradация синтетических имидов и аминокислот винной кислоты почвенными *Pseudomonas* // Международная Конференция «Современные тенденции в биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и значение его исследований», 11-13 ноября, Ереван, 2019, с. 21-24.
32. Микаелян Г., **Бабаян Б.**, Саргсян А., Багдасарян С., Мелкумян М., Оганесян Н. Исследование антибиотикорезистентности и ее распространения среди природных, почвенных условно-патогенных штаммов *Pseudomonas* // Международная Конференция «Современные тенденции в биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и значение его исследований», 11-13 ноября, Ереван, 2019, с. 107-109.
33. Mikaelyan A. R., Asatryan N. L., Bagdasaryan S. A., **Babayan B. G.** Antimicrobial Activity of Newly Synthesized Derivatives of Tartaric Acid Against the Multidrug Resistant Soil Strains of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* // Applied Research International Conferences (ARICON) on Pure and Applied Sciences ARICBE/ARICPAS 2019 Cambridge, UK, Conference Proceedings, November 19-20, Cambridge, UK, p 37.
34. **Babayan B.**, Sargsyan A., Bagdasaryan S., Mikaelyan G. The Differences of Plasmid Consistence in Multidrug Resistant Non-Pathogenic Strains of *Pseudomonas* Isolated from The Soil // 10th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2018), Yerevan, Armenia, October 19-22, 2018, Program and Abstracts, p. 7.

35. **Babayan B. G.**, Bagdasaryan S. A., Mikaelyan G. S., Kinosyan M. H., Davidyan T. S., Hovhannisyan N. A. Polysorbates biodegradation and the plasmid stability in soil opportunistic pathogenic strains of *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas*, International Conference “Microbes: Biology & Application” // Book of Abstracts, October 9-11, Yerevan, Armenia, 2019, p. 9.
36. Bagdasaryan S. A., **Babayan B. G.**, Sargsyan A. S., Kinosyan M. H., Davidyan T. S., Hovhannisyan N. A. Study of the *Pseudomonas* genes coding polyphenol oxidases, International Conference “Microbes: Biology & Application” // Book of Abstracts, October 9-11, Yerevan, Armenia, 2019, p. 21.

Բեյլա Գագիկի Բաբայան

***Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* ցեղերի որոշ տեսակների մանրէների բազմակայունության ուսումնասիրումը և դրա հաղթահարումը L-գինեթթվի սինթետիկ ածանցյալներով**

Ամփոփում

Բանալի բառեր. գինեթթվի սինթետիկ ածանցյալներ, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, բազմակայունություն, կենսաքայքայում, մոլեկուլային դոկինգ

Հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունությունը և հատկապես մանրէների հակաբիոտիկական բազմակայունությունը հանդիսանում է ժամանակակից բժշկության, գյուղատնտեսության և անասնաբուժության ամենաարդիական հիմնախնդիրներից մեկը: Նշված խնդրի օրեցօր աճող սրման պատճառով զգալի է մարդու, կենդանիների և բույսերի (ֆիտոպաթոգեն մանրէների) ախտածինների (պաթոգեն մանրէների) դեմ կիրառվող հակաբիոտիկների արդյունավետության նվազումը: Այս առումով շատ արդիական է նոր էկոլոգիապես անվտանգ հակամանրէային ակտիվ միացությունների որոնումը և դրանց հիման վրա հակամանրէային պատրաստուկների նոր դասերի մշակումը:

Եվ այս հիմնախնդրի լուծման հեռանկարային ուղղություններից է բույսերից մեկուսացված բնական ծագման հակաբակտերիալ, հակավիրուսային, հակասնկային և այլ ակտիվ միացությունների թիրախային դերիվատացումը՝ քիմիական մոդիֆիկացման միջոցով դրանց հակամանրէային հատկությունների համապատասխան ուժեղացմամբ:

Տվյալ աշխատանքում ուսումնասիրվել է L-գինեթթվի 6 նոր ածանցյալների՝ բենզիլիմիդի, բենզիլ կոմպլեքսային ամինաաղի, ցիկլոհեքսիլիմիդի, ցիկլոհեքսիլ կոմպլեքսային ամինաաղի, ֆենիլիմիդի և ֆենիլ կոմպլեքսային ամինաաղի, հակամանրէային ազդեցությունը հողային *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* և *Xanthomonas* ցեղերի որոշ տեսակների ներկայացուցիչների նկատմամբ:

Ըստ ստացված արդյունքների, 210 բնական հողային շտամերից մեծամասնության մոտ դիտվել է, տարբեր դասերին պատկանող, 13 հակաբիոտիկներից (պենիցիլին, ամպիցիլին, աուգմենտին, ամոքսիցիլին, ցեֆիքսիմ, ցեֆտրիաքսոն, տետրացիկլին, քլորամֆենիկոլ, կանամիցին, գենտամիցին, ստրեպտոմիցին ազիտրոմիցին ցիպրոֆլոքագաին) մեկ կամ ավելի նյութերի նկատմամբ հակաբիոտիկակայունության (բազմակայունության)

ստաբիլություն ոչ ընտրողական պայմաններում: β -լակտամային հակաբիոտիկների և β -լակտամազների արգելակիչ (ինհիբիտոր)՝ կլավուլանաթթվի նկատմամբ կայունությունը տարածված է ուսումնասիրված մանրէների մոտ: Դիտվել է նաև, բժշկության մեջ լայնորեն կիրառվող ակտիվության, լայն սպեկտրի հակաբիոտիկների՝ ազիտրոմիցինի, գենտամիցինի, ցեֆտրիաքսոնի և ցիպրոֆլոքսացինի նկատմամբ կայունություն: Հավանաբար դա պայմանավորված է բջջում առկա էֆֆլուքս համակարգերով:

Ըստ տրանսֆորմացման փորձերից ստացված արդյունքների՝ կայունությունը պայմանավորված է պլազմիդային և նուկլեոիդային գեներով: Ուսումնասիրված *Pseudomonas*, *Xanthomonas* և *Stenotrophomonas* ցեղերին պատկանող ռեցիպիենտ շտամների մոտ տվյալ պլազմիդները կայունորեն ռեպլիկացվում են (կրկնապատկվում են), սակայն անկայուն են *E. coli*-ի մեջ: Հավանաբար դա պայմանավորված է *E. coli*-ի և նշված երեք ցեղերի ներկայացուցիչների մոտ պլազմիդների ռեպլիկացման նուկլեոիդային կարգավորման տարբերություններով: Ուսումնասիրված մանրէների մոտ հայտնաբերված պլազմիդներից մի քանիսը չեն փոխանցում 13 նշված հակաբիոտիկների նկատմամբ կայունություն (*P. aeruginosa* 9058):

Հակաբիոտիկակայունությունը փոխանցող պլազմիդների կայունության պատճառները հասկանալու համար կատարվել է արտաբջջային լիպազների և պոլիֆենոլ օքսիդազների որակական որոշում: Կատարված փորձերի ադոպտացումն հայտնաբերվել են բակտերիալ քրոմոսոմի և պլազմիդների գեներով կողավորված տարբեր լիպազներ: Դրանք տարբերվում են իրենց սուբստրատային սպեցիֆիկությամբ: Փորձերը ցույց տվեցին, որ հայտնաբերված լիպազները փոխանցող պլազմիդները կայուն չեն: Նուկլեոիդով կողավորված և պլազմիդների կայունության հետ չառնչվող պոլիֆենոլ օքսիդազներ հայտնաբերվել են հիմնականում ոչ ախտածին *P. chlororaphis* և *S. maltophilia P. geniculata* որոշ շտամերում: Որոշ շտամեր ունեն մեկից ավելի տեսակի պլազմիդներ:

Ըստ ՊՇՌ- հետազոտության, կլինիկական ախտածինների կայունության գեներ հայտնաբերվել են որոշ հողային շտամների պլազմիդներում և նուկլեոիդում. քլորամֆենիկոլի նկատմամբ կայունություն՝ կողավորված *catB7* նուկլեոիդային գենով, կանամիցինի և ամպիցիլինի նկատմամբ կայունություն՝ նուկլեոիդային և պլազմիդային *aph(3')IV*, *aac(6)II*, *blaOXA-10* գեներով:

Հայտնաբերվել են կայունության ուժգնացման և նվազման մուտացիաներ. *P. putida* 9249, *P. fluorescens* 9070, 9075 շտամերի *blaOXA-10* գենում կլավուլանաթթվի նկատմամբ կայունության մուտացիա, *P. fluorescens* 9087-ի *blaOXA-10* ակտիվության նվազում և *P. putida* 9249-ի *aac(6)II* ամբողջական ինակտիվացում:

Հայտնաբերվել են L-գինթթթվի նոր սինթետիկ ածանցյալների՝ բենզիլ-ֆենիլ-ցիկլոհեքսիլ- տեղակալված իմիդներ և համապատասխան կոմպլեքսային ամինային աղեր մանրէասպան և բակտերիոստատիկ ազդեցություններ: Դրանց նվազագույն արգելակող կոնցենտրացիաները տատանվում են (31,8նգ/մլ – 768մկգ/մլ)՝ կախված տվյալ միացության մեջ պարունակվող ֆունկցիոնալ խմբից և տվյալ մանրէի շտամից:

Ըստ դոկինգ-վերլուծության, L-գինթթթվի նոր սինթետիկ ածանցյալների ազդման մեխանիզմը, հավանաբար, կապված է ֆունկցիոնալ խմբերի (ֆենիլ-, բենզիլ- և ցիկլոհեքսիլ- տեղակալիչների) և թաղանթային սպիտակուցային ընկալիչների և

բիոֆիլմի տրանսկրիպցիոն գործոնների հիդրոֆոբ ամինաթթուների ռադիկալների փոխազդեցության հետ: Դրա հիման վրա այս նյութերը կարող են դիտարկվել, որպես հակաբիոտիկների այլընտրանք՝ պայմանավորված ազդման այլ թիրախներով:

L-գինեթթվի սինթետիկ ածանցյալները չեն արգելակում *P. chlororaphis* և *P. fluorescens*, *E. coli* շտամերի մեծամասնության աճը: Դրանցից ոմանք ունակ են կենսաքայքայել L-գինեթթվի ֆենիլ-, բենզիլ- և ցիկլոհեքսիլ- կոմպլեքսային ամինաաղերը:

Ըստ տրանսֆորմացման արդյունքներին, L-գինեթթվի նոր սինթետիկ ածանցյալների նկատմամբ կայունությունը չի փոխանցվում պլազմիդներով: Ըստ տրանսֆորմացման արդյունքներին նաև ապացուցվել է այդ միազույությունների կենսաքայքայման հատկության պլազմիդային փոխանցման բազակայումը: Ենթադրվում է, որ L-գինեթթվի սինթետիկ ածանցյալների նկատմամբ կայունության և դրանց կենսաքայքայման պլազմիդային փոխանցման բազակայումը:

Հավանաբար, դա կապված է պոլիֆենոլ օքսիդազները կոդավորող, գեների նուկլեոտիդային բույթի հետ:

Այսպիսով, ենթադրում է L-գինեթթվի ուսումնասիրված նոր սինթետիկ ածանցյալների, որպես հակամանրէային նյութեր, կիրառման պոտենցիալ էֆֆեկտիվությունը (արդյունավետությունը) և հարաբերական էկոլոգիական անվտանգությունը:

Bella G. Babayan

The study of *Multi-Drug Resistance in Bacteria of Pseudomonas, Stenotrophomonas, Xanthomonas* Genera Several Species and The Overcoming of It by L-tartaric Acid Synthetic Derivatives.

Summary

Key words: Tartaric acid synthetic derivatives, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, multi-drug resistance, biodegradation, molecular docking.

The problem of antibiotic-resistance and especially the multi-drug resistance of microorganisms is one of the most actual problems of contemporary medicine, agriculture and veterinary. Due to the day by day escalating aggravation of the mentioned problem the decrease of the efficiency of the antibiotics which are used against the pathogens of human, animals and plants (phytopathogenic microorganisms) is significant. In these regards, the search of novel ecologically safe antimicrobial active compounds and the elaboration of new classes of antimicrobial preparations based on them is very actual.

And the one of the prospective directions of the solution of this problem is target derivatization of native antibacterial, antiviral, antifungal compounds and other active compounds which are isolated from plants with appropriate enhancing of their antimicrobial properties by chemical modification

In current research antimicrobial effects of L-tartaric acid 6 new derivatives: benzylimide, benzyl complex aminosalt, cyclohexylimide, cyclohexyl complex aminosalt, phenylimide, phenyl complex aminosalt were studied on some species of soil representatives of *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* genera.

According to the results, which were carried out, for the majority of 210 the studied soil strains of bacteria, the stable resistance to 1 or more substances from 13 used antibiotics (penicillin, ampicillin, augmentin, amoxicillin, cefixime, ceftriaxone, tetracycline, chloramphenicol, kanamycin, gentamycin streptomycin, azithromycin, ciprofloxacin) of different classes in non-selective conditions were defined. The resistance to β -lactamic antibiotics and the inhibitor of β -lactamases – clavulanic acid is common among the studied bacteria. Also, the resistance to widely used in medicine antibiotics of activity large spectrum, such as like azithromycin, gentamicin, ceftriaxone and ciprofloxacin was observed. Probably it is defined by the efflux systems, which present in cell.

Due to the results of transformations which were carried out, it is defined by both plasmids and nucleoid. Replication of these plasmids in recipients from the representatives of *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas* genera is stable and it is unstable in case of *E. coli* recipients. Probably it is caused by the differences in nucleoid regulation of replication of these plasmids between the mentioned genera and *E. coli*. In some strains of the studied genera of bacteria, one part of the detected plasmids doesn't transmit the resistance to studied 13 antibiotics (*P. aeruginosa* 9058).

For the understanding of causes of the stability of plasmids, which transmit the resistance to antibiotics, the bacterial extracellular lipases and polyphenol oxidases were defined qualitatively. As a result of the carried out experiments, there were found different extracellular lipases, which were encoded by both genes of bacterial chromosome and plasmids of bacteria. The lipases which were differing by their substrate specificity were found. The experiments have demonstrated that the plasmids, which are transmitting that lipases are not stable in recipient cells. Polyphenol oxidases, which are encoded by nucleoid and not related to the antibiotic resistance stability, were detected predominantly in non-pathogenic representatives of *P. chlororaphis* and in some strains of *S. maltophilia* and *P. geniculata*.

Some studied strains have more than one type of plasmids. According to the data collected from PCR analysis, the genes of antibiotic resistance of the clinical pathogens were detected on plasmids and nucleoid of some soil strains: the resistance to chloramphenicol, caused by *catB7* of nucleoid, the resistance to kanamycin and the resistance to ampicillin, caused by *aph(3')IV*, *aac(6')II*, *blaOXA-10* of nucleoid and plasmid.

Mutations of activity increase and decrease were identified: clavulanic acid resistance mutation of *blaOXA-10* gene in *P. putida* 9249, *P. fluorescens* 9070, 9075; activity decrease mutation in *blaOXA-10* gene of *P. fluorescens* 9087; complete inactivation mutation of *aac(6')II* gene in *P. putida* 9249.

Bactericidal and bacteriostatic effects of tartaric acid new synthetic derivatives: benzyl-phenyl- cyclohexyl-substituted imides and the appropriate complex amino salts of tartaric acid were detected. Their minimum inhibitory concentrations vary (31.8 ng/ml – 768 μ g/ml), depends to the particular functional group of current compounds and the particular strain of microorganism.

According to docking analysis, the mechanism of activity of new synthetic derivatives of L-tartaric acid is probably based on functional groups (benzyl- phenyl- and cyclohexyl-substituents) interaction with hydrophobic amino acid radicals of membrane receptor proteins and of biofilm transcription factors. Based on it, these compounds can be considered, as an alternative to antibiotics, due to alternative targets of effect.

L-tartaric acid synthetic derivatives don't inhibit the growth of non-pathogenic *P. chlororaphis* and the most of *P. fluorescens*, *E. coli* strains. Some of them are able to biodegradation of some of the studied compounds: phenyl-, benzyl- and cyclohexyl- complex amino salts of L-tartaric acid.

According to the results of transformations, the resistance to tartaric acid new derivatives and is not transmitting by plasmids. Due to the results of transformation also it was demonstrated the absence of these compounds biodegradation property transmission by plasmids. Probably, the absence of transmission of resistance to tartaric acid new synthetic derivatives and the

biodegradation of the mentioned compounds by the identified plasmids is related to the nucleoid character of genes, which are encoding of the studied polyphenol oxidases.

Thus, it suggests the potential ecological safety of the studied L-tartaric acid derivatives usage as effective and a comparably safe antimicrobial agent.