

УДК 577.29

Бактериоцин микробиоты ротовой полости енотовидной собаки подавляет рост метициллинрезистентного патогена *Staphylococcus aureus*

М. Н. Баранова¹, Е. А. Соболева¹, М. А. Корниенко², М. В. Малахова², Ю. А. Мокрушина^{1,3}, А. Г. Габибов^{1,3}, С. С. Терехов¹, И. В. Смирнов^{1,3*}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), Москва, 117997 Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина федерального медико-биологического агентства», Москва, 119435 Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, 119991 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступило в редакцию 11.12.2023

Принято к печати 18.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27349

РЕФЕРАТ Глобальное распространение антибиотикорезистентности патогенных бактерий является одной из ключевых проблем XXI века. Разработка новых технологических платформ, основанных на анализе антибактериальной активности индивидуальных представителей микробиома, позволила проводить широкомасштабный поиск антимикробных агентов различного механизма действия. Ввиду своей малой изученности, микробиом диких животных можно рассматривать как естественный резервуар биоразнообразия для поиска новых антибиотиков. В данной работе с использованием микрофлюидной технологии ультравысокопроизводительного скрининга из микробиома ротовой полости енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) выделен штамм бактерии *Staphylococcus pseudintermedius* E18, с высокой эффективностью подавляющий рост метициллинрезистентного патогена *S. aureus* (MRSA). Показано, что основным действующим веществом штамма *S. pseudintermedius* E18 является бактериоцин с молекулярной массой 27 кДа, обладающий высоким положительным зарядом и чрезвычайно узким спектром активности. Бактериоцин *S. pseudintermedius* E18 инактивировался под действием повышенной температуры, протеиназы К и EDTA. Дальнейшие исследования структуры бактериоцина *S. pseudintermedius* E18 позволят понять механизм его антимикробного действия, что открывает перспективы разработки новых антимикробных препаратов белковой природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ультравысокопроизводительный скрининг, антибиотикорезистентность, антимикробные пептиды, литические ферменты.

Поиск новых противомикробных препаратов необходим, поскольку бактерии постоянно эволюционируют, приобретая устойчивость к новым антибиотикам [1]. Использование новых платформ, задействующих методы метаболомики, геномного и транскриптомного секвенирования с последующим биоинформатическим анализом, а также внедрение альтернативных способов культивирования микроорганизмов открывают новые возможности для скрининга антибиотической активности природных соединений.

Микробиомы животных представляют собой уникальный резервуар для поиска новых антимикробных агентов [2–4]. Пробиотические микроорганизмы привлекают особый интерес в качестве потенциальных продуцентов антибиотиков [5, 6]. Несмотря на то, что пробиотические штаммы и бактерии-комменсалы могут оказывать не прямое действие на микробиом, влияя на иммунную систему хозяина [7] или продуцируя функционально значимые ферменты [8], для большинства бактериоцинов характерен механизм прямого убийства патогенов.

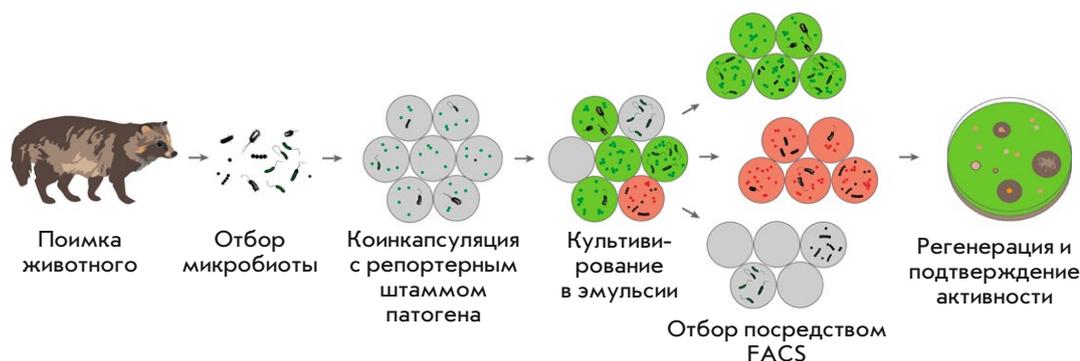


Рис. 1. Схема платформы ультравысокопроизводительного скрининга для отбора микроорганизмов, ингибирующих рост бактерии-мишени

Таблица 1. Масс-спектрометрическая идентификация и антагонистическая активность отобранных штаммов бактерий-продуцентов в отношении золотистого стафилококка

Штамм	Микроорганизм	Зоны ингибирования роста <i>S. aureus</i> , диаметр, мм	Максимальная активность в жидкой культуре	
			Кратность ингибирующего разведения	Время культивирования, сут
E14	<i>Bacillus pumilus</i>	11 ± 2	61 ± 9	2
E18	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	5 ± 1	256 ± 47	4
E32	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	4* ± 1	5 ± 1	2
EB10	<i>Pasteurella dagmatis</i>	0.9 ± 0.1	8 ± 1	8
EB16	<i>Ralstonia insidiosa</i>	3.1 ± 0.4	-	-
EB27	<i>Curtobacterium luteum</i>	-	4 ± 1	1
EB30	<i>Brachybacterium sp.</i>	-	2.1 ± 0.5	1

*Диффузная зона ингибирования.

В этой работе с целью выделения штаммов-продуцентов веществ, обладающих антимикробной активностью в отношении золотистого стафилококка и идентификации метаболитов, обуславливающих их антагонистические свойства, проведен ультравысокопроизводительный скрининг микробиома слюны енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*).

Ранее нами была описана платформа ультравысокопроизводительного скрининга микробных сообществ (рис. 1) [2, 9], основанная на культивировании одиночных клеток микроорганизмов с репортерным штаммом бактерий в изолированных каплях двойной эмульсии с последующим выделением активных фенотипов методом флуоресцентно-активируемой клеточной сортировки. Эту платформу применили для профилирования микробиома ротовой полости енотовидной собаки и выявления штаммов, активных в отношении золотистого стафилококка.

В результате скрининга получили шесть фенотипически различных штаммов, воспроизводимо ингибирующих рост *Staphylococcus aureus* на агаризованной среде ВНИ и в жидкой культуре (активность оценивали методом двухкратных серийных разведений). Штаммы идентифицировали методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-

активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) (табл. 1).

Наибольшей активностью в отношении *S. aureus* в жидкой среде обладал штамм *S. pseudintermedius* E18 (рис. 2А). Для наработки и идентификации активного вещества проведен более подробный анализ динамики антагонистического действия штамма-продуцента (рис. 2Б).

Для очистки активного соединения применили твердофазную экстракцию с использованием сорбента LPS-500 (табл. 2). Большая часть вещества не могла быть элюирована повышением содержания ацетонитрила в буферном растворе при pH 5.0, для элюции использовали 0.1% трифторуксусную кислоту (TFA) в водном растворе ацетонитрила.

Инкубация соединения, продуцируемого штаммом E18, в течение 1.5 ч при 60°C приводила к утрате его антибиотической активности. В связи с термолабильностью и характером элюции при твердофазной экстракции была выдвинута гипотеза о высокомолекулярной природе вещества. Активные образцы среды культивирования с добавлением 50 мМ фосфата натрия с pH 7.5 подвергали действию протеиназы К (0.1 мг/мл). После 3 ч инкубации при 37°C наблюдалась полная потеря ингибирующей активно-

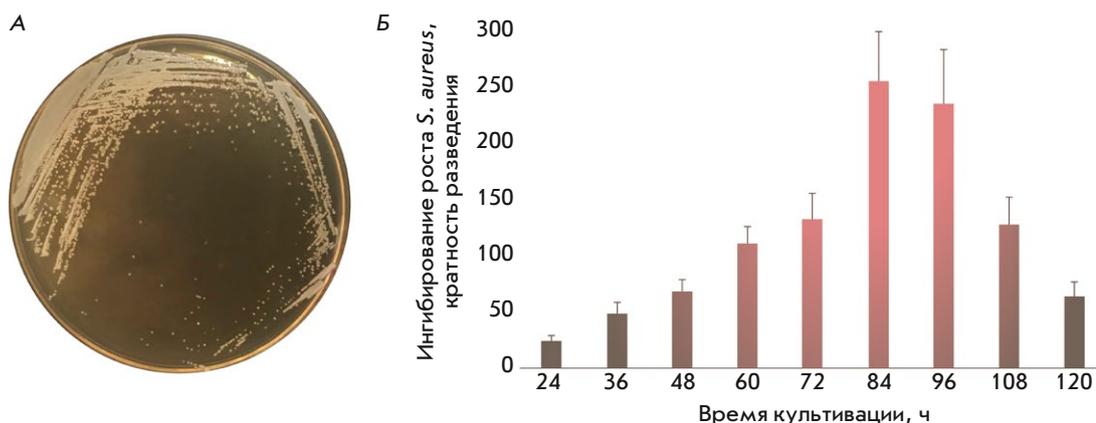


Рис. 2. Фенотип штамма-продуцента E18 на агаризованной среде ВНИ (А) и анализ динамики продукции метаболитов, ингибирующих рост *S. aureus* (Б)

Таблица 2. Очистка соединения, продуцируемого штаммом E18, методом импульсной твердофазной экстракции с использованием сорбента LPS-500

Буферный раствор	А	Б	А + В, %В		
			40	70	100
Активность по ингибирующему разведению, % от нанесенной пробы	2 ± 1	9 ± 1	12 ± 3	68 ± 7	11 ± 2

Примечание. Буфер А: 10 мМ NH₄OAc, 5% ацетонитрил, рН 5.0; буфер Б: 10 мМ NH₄OAc, 80% ацетонитрил, рН 5.0; буфер В: 0.1% TFA, 80% ацетонитрил.

сти в отношении *S. aureus*. Ввиду предположительно белковой природы соединения для его дальнейшей очистки использовали соответствующие методы.

Первая стадия очистки включала ионообменную хроматографию с использованием сорбента SP-sepharose (табл. 3).

На второй стадии очистки использовали хроматографическую колонку Heparin-sepharose (GE Healthcare, США), буферные растворы А (20 мМ HEPES, рН 7.0) и Б (20 мМ HEPES, 1 М NaCl, рН 7.0) со скоростью потока 1 мл/мин. Элюцию проводили линейным градиентом буфера Б, 20 мин (рис. 3А,Б). Время удержания косвенно свидетельствовало о высоком положительном заряде белка.

На третьей стадии очистки применяли гель-фильтрационную хроматографию с использованием колонки Superdex 75 и буферного раствора 20 мМ HEPES, 250 мМ NaCl, рН 7.0 со скоростью 0.4 мл/мин. Активность соответствовала белку размером приблизительно 27 кДа (рис. 3В), время удержания составило приблизительно 23 мин.

Очищенный белок использовали для функциональных исследований. Минимальная ингибирующая концентрация этого белка в отношении *S. aureus* составила 0.05 ± 0.02 мкг/мл. Полученный бактериоцин оказался высокоспецифичным – МИК в отношении *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter*

cloacae, *Streptococcus pneumoniae* и *Bacillus cereus* была выше 10 мкг/мл, что свидетельствует об отсутствии антимикробной активности.

Таким образом, штамм *S. pseudintermedius* продуцирует бактериоцин III класса – термолабильный полипептид размером 27 кДа, ингибирующий рост бактерий, рода *Staphylococcus* [10–12]. Бактериоцины III класса включают бактериолизины, тайлоцины и нелитические белки. Наиболее изученным подклассом являются бактериолизины. Известные представители бактериолизинов относятся к металл-зависимым протеазам, катализирующим гидролиз пептидных мостиков или створовых пептидов в пептидогликане бактерии-мишени [12]. Было выдвинуто предположение, что выделенный из *S. pseudintermedius* белок также является пептидогликан-гидролазой. Инкубация белка в течение 15 мин при 25°C в присутствии 10 мМ EDTA приводила к полной потере его активности. Таким образом, вещество, обеспечивающее антистафилококковую активность штамма *S. pseudintermedius*, является металл-зависимым ферментом, что характерно для бактериолизинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие резистентности к антибиотикам у патогенных бактерий привело к возобновлению интереса к противомикробным средствам, разрушающим бактериальные мембраны и клеточные стенки

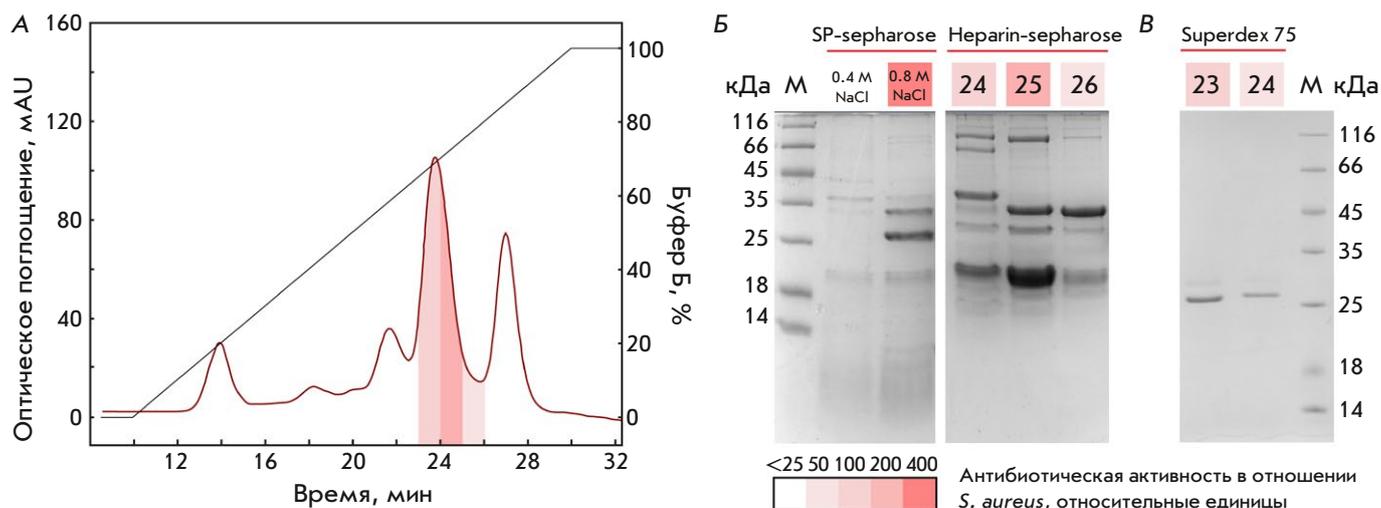


Рис. 3. Хроматографическая очистка белка, определяющего антибиотическую активность штамма *S. pseudintermedius* E18. Красным обозначены фракции, обладающие наибольшей антибактериальной активностью. А – репрезентативная хроматограмма, полученная при фракционировании активных метаболитов *S. pseudintermedius* E18 с использованием смолы Heparin-sepharose. Б – репрезентативные электрофореграммы (15% ПААГ). Очистка белка методом хроматографии с использованием сорбента SP-sepharose и последующая очистка с использованием колонки Heparin-sepharose. В – репрезентативная электрофореграмма. Фракции, полученные в результате очистки белка методом гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 75

Таблица 3. Очистка соединения, продуцируемого штаммом E18, методом катионообменной хроматографии с использованием сорбента SP-sepharose

Содержание буфера Б, %	0	20	40	60	80	100
Активность по ингибирующему разведению, % от нанесенной пробы	6 ± 5	2 ± 1	15 ± 3	26 ± 7	21 ± 5	11 ± 2

Примечание. Буфер А: 10 мМ NH₄OAc, pH 6.0; буфер Б: 10 мМ NH₄OAc, 1 М NaCl, pH 6.0. Для дальнейшей работы использовали фракции, соответствующие 60 и 80% содержания буфера Б (600 и 800 мМ NaCl).

[13]. В результате ультравысокопроизводительного скрининга микробиоты енотовидной собаки обнаружен штамм бактерии *S. pseudintermedius* E18. Посредством хроматографического фракционирования показано, что этот штамм продуцирует ан-

тимикробный агент, являющийся литическим ферментом. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
- Adnani N., Rajski S.R., Bugni T.S. // Nat. Prod. Rep. 2017. V. 34. № 7. P. 784–814.
- Akbar N., Siddiqui R., Sagathevan K.A., Khan N.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 10. P. 3955–3964.
- Pereira W.A., Mendonça C.M.N., Urquiza A.V., Marteinsson V.P., LeBlanc J.G., Cotter P.D., Villalobos E.F., Romero J., Oliveira R.P.S. // Microorganisms. 2022. V. 10. № 9. P. 1705.
- Liao S.F., Nyachoti M. // Anim. Nutr. 2017. V. 3. № 4. P. 331–343.
- Liang L., Yang C., Liu L., Mai G., Li H., Wu L., Jin M., Chen Y. // Microb. Cell Fact. 2022. V. 21. № 1. P. 88.
- El-Saadony M.T., Alagawany M., Patra A.K., Kar I., Tiwari R., Dawood M.A.O., Dhama K., Abdel-Latif H.M.R. // Fish Shellfish Immunol. 2021. V. 117. P. 36–52.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
- Meade E., Slattery M.A., Garvey M. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 1. P. 32.
- Heng N.C.K., Tagg J.R. // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 2. P. 160.
- Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., Noskova S. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 9. P. 553.
- Bush K. // Rev. Sci. Tech. 2012. V. 31. № 1. P. 43–56.