

УДК 574.1

Антибактериальная активность дрожжей из уникальных биоценозов

О. В. Шуленина¹, Е. А. Суханова¹, Б. Ф. Яровой¹, Е. А. Толстыко¹, А. Л. Коневега^{1,2,3*},
Е. В. Полесскова^{1,2**}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, 188300 Россия

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

*E-mail: Konevega_AL@pnpi.nrcki.ru

**E-mail: Polesskova_EV@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 30.09.2024

Принята к печати 24.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27527

РЕФЕРАТ Пополнение банка веществ, обладающих терапевтическим потенциалом, является важной задачей современной биомедицины. Несмотря на достижения в области химического синтеза, природное многообразие организмов и микроорганизмов остается важным источником биологически активных соединений. Представлены результаты изучения уникальной коллекции, содержащей более 3000 образцов дрожжей, обнаруженных на полуострове Камчатка, Курильских островах и острове Сахалин. Поскольку дрожжи и бактерии сосуществуют в различных местах обитания и могут взаимодействовать между собой, мы проанализировали антибактериальную активность коллекционных штаммов дрожжей в отношении клеток *E. coli* с использованием флуоресцентного бактериального репортера. Обнаружено, что Сахалинские штаммы преимущественно стимулируют рост бактерий, в то время как большинство штаммов, обнаруженных на полуострове Камчатка, демонстрируют ингибирующие свойства. При этом образцы с наиболее выраженной антибактериальной активностью, идентифицированные как представители *Cryptococcus (Naganishia)*, были обнаружены в ущелье в окрестностях п. Паужетка на полуострове Камчатка на полыни (*Artemisia vulgaris*) и татарнике (*Onopordum acanthium*). Наши данные указывают на важность совокупности растения и места его произрастания для возникновения дрожжевых штаммов, секретирующих антибактериальные соединения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотики, биоразнообразие, дрожжи, коллекция, флуоресцентная репортерная система.

ВВЕДЕНИЕ

Отсутствие строгого контроля за использованием антимикробных препаратов в медицине и животноводстве приводит к возникновению и распространению патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам [1], что делает необходимым создание новых лекарственных средств. Флора и фауна являются важным источником биологически активных соединений, прошедших проверку временем [2, 3]. Некоторые виды дрожжей хорошо изучены, поскольку они широко используются в пищевой промышленности или служат модельными организмами в научных исследованиях [4]. Известны дрожжевые метаболиты, которые снижают уровень холестерина в крови, действуют как иммуномодуляторы или проявляют противогрибковую активность [5]. Представители родов *Candida*, *Pichia*

и *Saccharomyces* также демонстрируют антибактериальную активность [5–8]. При этом дрожжи невероятно разнообразны в биологическом и химическом отношении, а популяции дрожжей, обитающие в труднодоступных регионах, недостаточно изучены и могут обладать уникальными свойствами [3].

В данной работе изучали коллекцию дрожжей, собранных на Дальнем Востоке России. Уникальность коллекции обусловлена территорией сбора образцов: Камчатка и Курильские острова входят в Тихоокеанское огненное кольцо, которое характеризуется повышенной вулканической и сейсмической активностью. Население этих территорий невелико, а туризм развит слабо, поэтому природа мало подвержена прямому влиянию цивилизации. Практически изолированный от материка полуостров Камчатка имеет самую высокую кон-

центрацию вулканов на Земле – более 300, из которых 30 действующие. На Камчатке и Курильских островах находятся густые сети горных рек, богатых пресной водой, озера с высокой минерализацией воды, в вулканических районах, подогреваемой вулканическими газами, и слабосоленые озера-лагуны. На склонах и в кратерах потухших вулканов активны гидротермальные, газовые и грязевые выбросы различной температуры и кислотности, содержащие высокие концентрации неорганических соединений. Сахалин расположен в тех же широтах, что и Камчатка, и Курильские острова, однако его обитатели не подвержены влиянию экстремальных факторов среды. Кроме того, Сахалинские образцы дрожжей, в отличие от других образцов коллекции, собраны ближе к районам деятельности человека.

Задачей данного исследования стало выявление и изучение образцов коллекции дрожжей, содержащих антимикробные соединения в своих культуральных жидкостях. Мы использовали репортерную систему, которая позволяет не только обнаруживать антимикробную активность, но и сортировать потенциальные антибактериальные соединения по механизму их действия. Такую систему с двойным флуоресцентным репортером, идентифицирующую вещества, вызывающие остановку рибосом или индуцирующие реакцию SOS-ответа из-за повреждения ДНК, успешно использовали для скрининга библиотеки синтезированных органических соединений [9] и экстрактов актиномицетов [10–13]. Данная тест-система разработана преимущественно для применения на твердых средах, что сводит к минимуму необходимость пипетирования, количество реагентов и расходных материалов. Однако анализ флуоресцентных репортерных белков на агаре не позволяет количественно оценить антибактериальное действие, обусловленное механизмами, отличными от остановки рибосом и повреждения ДНК. Примечательно, что чувствительность репортера, определенная с использованием нескольких антибиотиков, на агаре и в жидкой среде различалась на два порядка в пользу жидкой среды [9].

Таким образом, для обнаружения в культуральных жидкостях дрожжей даже небольших количеств биологически активных соединений, которые могли бы повлиять на жизнеспособность бактерий, мы адаптировали репортерную систему для анализа в жидкой среде. С целью еще большего повышения чувствительности системы мы использовали штамм *E. coli* JW5503, в котором отсутствует ген *tolC*, кодирующий важный компонент нескольких бактериальных эффлюкс-систем [14]. Данный вариант репортерной системы был протестирован с использованием 15 антибиотиков с известным механизмом действия.

Проведен анализ антибактериальной активности 810 образцов дрожжей, из которых 251 относился к коллекции, собранной на Сахалине, и 559 – на Камчатке. Сахалинские штаммы преимущественно стимулировали рост бактерий, в то время как большинство штаммов Камчатки проявляли ингибирующие свойства. Наши данные указывают на важность сочетания вида растения и места его произрастания для возникновения дрожжевых штаммов, секретирующих антибактериальные соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коллекция дрожжей и дрожжеподобных грибов

Коллекция дрожжей, насчитывающая более 3000 образцов, собрана в четырех экспедициях под руководством В.П. Степановой и Б.Ф. Ярового в экстремальные регионы России: на полуостров Камчатка и Курильские острова в августе–сентябре 1988, 1989, 1994 гг. и на о. Сахалин в августе–сентябре 2004 г. [15]. Микроорганизмы выделяли с живых растений, опавших частей растений, почвы и насекомых. Сбор субстратов производили на склонах вулканов, рядом с гидротермальными выбросами и внутри активных зон, в долинах рек и ручьев.

Чистые культуры дрожжей получали в лабораторных условиях. Штаммы дрожжей длительно хранили при -80°C в среде YPD (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 25% глицерина [16].

На начальном этапе формирования коллекции с применением морфологического и биохимического подходов идентифицировали видовую принадлежность 98 образцов, выбранных случайным образом [17, 18]. Среди отобранных штаммов были представители 20 известных видов: *Candida haemulorni*, *Candida sake*, *Candida sorbosivorans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus hungaricus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenei*, *Metschnikowia reukaufii*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Torulasporea delbrueckii*, *Tremella foliacea* и по одному представителю родов *Bullera* и *Trichosporon*. В данном списке представлены все три класса грибов: 1) аскомицеты – 6 видов; 2) базидиомицеты – 2 вида; 3) несовершенные грибы – 12 видов. Выявленное разнообразие видов в основном соответствует данным, полученным при изучении видового состава дрожжей, обитающих в северных широтах Западной Сибири и Аляски [19].

Ранее у группы штаммов коллекции была обнаружена способность поглощать радионуклиды и ионы тяжелых металлов [15, 20].

Получение культуральных жидкостей дрожжей

Дрожжевые клетки выращивали на чашках с агаризованной средой YPD в течение 3 суток при комнатной температуре. Отсутствие примесей контролировали по морфологии культур. Клетки помещали в жидкую среду YPD и инкубировали в течение 3 суток при комнатной температуре на шейкере-ротаторе. Культуральные жидкости отделяли от клеток центрифугированием (4000 *g*, 15 мин, 4°C) на центрифуге Union 5KR centrifuge (Hanil Science Industrial) и концентрировали в 15–20 раз на вакуумном центрифужном концентраторе Concentrator Plus (Eppendorf AG) при комнатной температуре в течение 8–9 ч. Образцы хранили при -20°C.

Двойная флуоресцентная репортерная система для идентификации веществ, вызывающих остановку рибосом или индуцирующих реакцию SOS-ответа

Репортерная плаزمида pDualrep2 несет ген *rfp* под контролем SOS-индуцибельного промотора *sulA* и ген, кодирующий белок Katushka2S, под контролем модифицированного триптофанового аттенуатора (триптофановые кодоны в нем заменены на аланиновые), управляемого промотором T5 [9, 21]. Модификация триптофанового аттенуатора приводит к нарушению движения рибосом из-за специфических ингибиторов трансляции, а не из-за голодания по триптофану.

Штамм *E. coli* JW5503 (лишенный гена *tolC*, кодирующего критический компонент эффлюксной системы), трансформированный репортерной плазмидой pDualrep2 (AmpR), синтезирует RFP в присутствии агентов, повреждающих ДНК (вызывающих SOS-ответ), и Katushka2S в присутствии веществ, тормозящих трансляцию [9]. Флуоресцентный сигнал RFP детектируется на 574 нм, при возбуждении на 553 нм; флуоресцентный сигнал Katushka2S – при 633 и 588 нм соответственно.

Анализ антибактериальной активности с применением репортерной системы

Клеточную культуру репортерного штамма выращивали до $OD_{600} = 0.5–1$ при 37°C в среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл и хранили при 4°C в течение ночи. На следующий день культуру разбавляли свежей средой LB до $OD_{600} = 0.1$. В лунки 96-луночного культурального планшета вносили по 200 мкл клеточной культуры. Образец добавляли к суспензии бактерий в лунках. Культуральный планшет инкубировали в шейкере-термостате при 37°C. Флуоресценцию репортерных белков RFP (553/574 нм) и Katushka2S (588/633 нм) и OD_{600} в лунках культурального планшета опре-

деляли на планшетном ридере Enspire2300 (Perkin Elmer). Полученные данные анализировали с помощью GraphPad Prism 6.0.

Для валидации репортерной системы в лунки с суспензией бактерий добавляли 2 мкл известных антибиотиков в сублетальных концентрациях. Были выбраны ингибиторы трансляции с различным механизмом действия, такие как гентамицин, хлорамфеникол, фузидиевая кислота, неомицин, гигромицин Б, канамицин, пурамицин, тетрациклин, эритромицин и стрептомицин. Панель препаратов, вызывающих SOS-ответ, состояла из налидиксовой кислоты, левофлоксацина, цiproфлоксацина и рифампицина.

К суспензии бактерий в лунках планшета добавляли по 5 мкл концентрированной культуральной жидкости. При таком способе дозирования концентрация образца в лунке планшета была в 2–2.5 раза ниже исходной неконцентрированной. Образцы с наибольшими ингибирующими свойствами тестировали в трех повторах.

Обработка данных

Мы вычисляли S/S_0 , где S – величина репортерного флуоресцентного сигнала или OD_{600} репортерной бактериальной культуры в присутствии тестового образца, S_0 – величина репортерного флуоресцентного сигнала или OD_{600} репортерной бактериальной культуры в отсутствие добавок.

Для расчета интервала фоновых значений использовали значения S/S_0 в контроле. Нормальность распределения была подтверждена с уровнем достоверности 99% с использованием теста D'Agostino-Pearson omnibus в GraphPad Prism 6.0. Фоновый интервал определяли как $[\text{mean}-3\sigma; \text{mean}+3\sigma]$. Интервалы фоновых значений: репортерный сигнал SOS-ответа спустя 5 ч [0.87; 1.13], репортерный сигнал SOS-ответа спустя 24 ч [0.82; 1.18], репортерный сигнал ингибирования трансляции спустя 5 ч [0.93; 1.07], репортерный сигнал ингибирования трансляции спустя 24 ч [0.85; 1.15], OD_{600} спустя 5 ч [0.95; 1.05], OD_{600} спустя 24 ч [0.97; 1.03].

Таксономическая идентификация

Для таксономической идентификации дрожжевых штаммов клеточные стенки разрушали зимолизой (Zymo Research) в растворе 1 М сорбитола и 0.1 М EDTA (pH 8.0). Геномная ДНК была получена с использованием DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) и визуализирована с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Последовательности внутреннего транскрибируемого региона ITS1-5.8S-ITS2 и домены D1/D2 26S рДНК (большой рибосомной субъединицы) [22] были амплифицирова-

ны с использованием праймеров, перечисленных в табл. 1. ПЦР-продукты очищали с использованием NucleoSpin Gel и PCR clean-up kit (Macherey-Nagel) и секвенировали с использованием тех же праймеров. Результаты секвенирования обрабатывали с помощью The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Валидация репортерной системы с помощью набора известных антибиотиков

Для проверки специфичности анализа антибактериальной активности в жидкой среде с помощью репортерной системы мы выбрали ряд ингибиторов с различными механизмами действия. Такой выбор позволял гарантировать, что все антибиотики подавляют рост бактерий, тогда как синтез репортерных белков происходит избирательно в результате остановки рибосомы (экспрессия флуоресцентного репортерного белка *Katushka2S*) или повреждения ДНК (экспрессия RFP). Для визуализации профиля экспрессии репортеров использовали 5–6 сублетальных концентраций антибиотиков.

Подавляющее большинство ингибиторов, мишенью которых является рибосома, блокируют определенные реакции трансляции, вызывая остановку рибосомы. Например, хлорамфеникол (фениколы) и эритромицин (макролиды) связываются на входе канала выхода пептида и препятствуют образованию пептидной связи в зависимости от длины и последовательности растущей аминокислотной цепи [23, 24]. Оба антибиотика значительно активируют экспрессию *Katushka2S* (рис. 1). Сравнимая индукция *Katushka2S* наблюдалась при добавлении ингибиторов транслокации: гигромицина В (аминогликозиды), который блокирует движение тРНК в ходе элонгации [25], и фузидиевой кислоты (фузидины), которая ингибирует диссоциацию EF-G от рибосомы [26]. Тетрациклин (поликетины), связывающийся на малой субъединице рибосомы и влияющий на доставку тРНК на рибосому [27], и пурамицин, встраивающийся в растущую полипептидную цепь, вызывая ее преждевременную терминацию [28], привели к увеличению уровня флуоресценции репортерного белка выше базового уровня после 24 ч инкубации.

Аминогликозидные антибиотики нарушают процесс трансляции в основном за счет снижения селективности рибосомы, что приводит к включению неправильных аминокислот в растущую пептидную цепь, а не к остановкам рибосомы [29]. Неомицин индуцировал флуоресценцию репортерного белка через 5 ч инкубации с последующим исчезновением сигнала через 24 ч, тогда как другие представите-

Таблица 1. Праймеры, используемые для таксономической идентификации

Регион	Праймер [22]
ITS1-5.8S-ITS2	ITS1 (прямой) 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 (обратный) 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
26S рДНК (часть 1)*	LROR (прямой) 5'-ACCCGCTGAACCTTAAGC-3' LR3 (обратный) 5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3'
26S рДНК (часть 2)*	LR3R (прямой) 5'-GTCTTGAACACGGACC-3' LR7 (обратный) 5'-ТАСТАССАССААГАТСТ-3'

*ПЦР-продукт 26S рДНК, полученный с помощью праймеров LROR и LR7, состоит более чем из 1000 п.н. Для удобства работы этот ПЦР-продукт получен с использованием 4 праймеров.

ли группы (гентамицин, канамицин и стрептомицин) вообще не стимулировали синтез *Katushka2S*.

Добавление хинолонов (налиндиксовая кислота, левофлоксацин, ципрофлоксацин), блокирующих репликацию ДНК [30], и ансамицина (рифампицин), останавливающего синтез РНК в клетке [31], приводит к снижению уровня флуоресценции *Katushka2S* ниже фонового уровня практически при всех протестированных концентрациях. В то же время экспрессия RFP существенно усиливалась в течение всего времени эксперимента с диапазоном увеличения сигнала до 15 раз по сравнению с необработанными клетками после 5 ч инкубации. Примечательно, что некоторые ингибиторы трансляции также стимулировали появление сигнала RFP, однако ни один из них не обеспечивал превышение соотношения $S/S_0 = 2$ в течение 24 ч инкубации.

Таким образом, 5 ч инкубации абсолютно достаточно, чтобы сделать вывод о том, активирует ли исследуемое вещество SOS-ответ, тогда как выявление соединений, приводящих к остановкам рибосом, может потребовать продления инкубации до 24 ч.

Анализ антибактериальной активности культуральных жидкостей дрожжей

Мы проанализировали антибактериальную активность всей Сахалинской коллекции, содержащей 251 штамм (рис. 2). Скорость роста бактерий снижали 11 образцов культуральных жидкостей, однако ни один из них не активировал экспрессию репортерных белков. В то же время 233 образца стимулировали рост клеток, вероятно, из-за присутствия некоторых питательных компонентов. Примечательно, что среди стимуляторов мы обнаружили 74 образца, вызы-

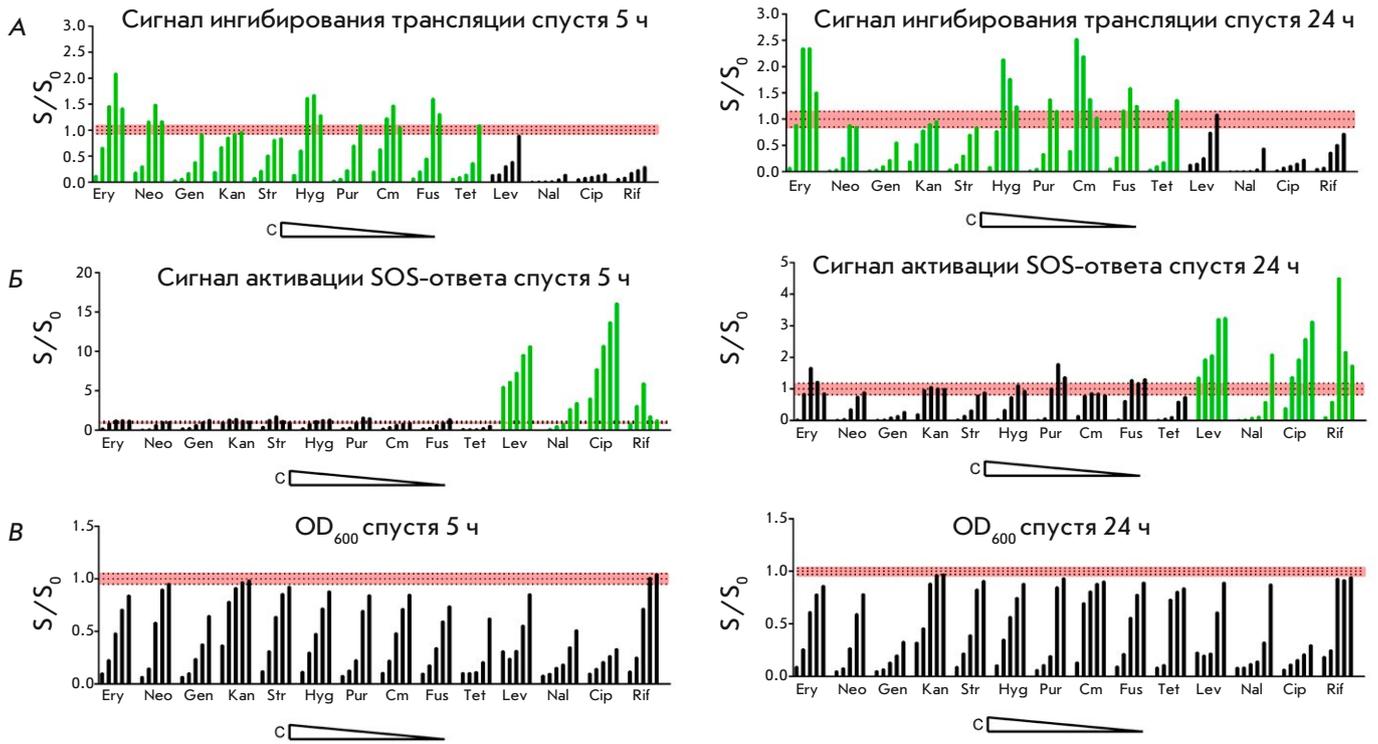


Рис. 1. Валидация репортерной системы с помощью набора известных антибиотиков. По вертикальной оси отложены значения отношения S/S_0 , где S – значение флуоресцентного репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца. На горизонтальной оси указаны антибиотики; концентрации (C) каждого антибиотика расположены в порядке убывания. Эритромицин (Ery) 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл; неомицин (Neo) 20, 10, 5, 2.5, 1.25 мкг/мл; гентамицин (Gen) 20, 10, 5, 2.5, 1.25 мкг/мл; канамицин (Kan) 30, 15, 7.5, 3.8, 1.9 мкг/мл; стрептомицин (Str) 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0.8 мкг/мл; гигромицин Б (Hyg) 100, 50, 25, 12.5, 6.3 мкг/мл; пурамицин (Pur) 15, 7.5, 3.8, 1.9, 0.9 мкг/мл; хлорамфеникол (Cm) 0.7, 0.35, 0.18, 0.09, 0.04 мкг/м; фузидиевая кислота (Fus) 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл; тетрациклин (Tet) 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075 мкг/мл; левофлоксацин (Lev) 0.1, 0.05, 0.025, 0.013, 0.006 мкг/мл; налидиксовая кислота (Nal) 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 мкг/мл; ципрофлоксацин (Cip) 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06 мкг/мл; рифампицин (Rif) 25, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6 мкг/мл. Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал остановки рибосомы спустя 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации. Зеленые столбцы обозначают антибиотики, воздействующие на рибосому, черные – антибиотики, активирующие SOS-ответ. Б – репортерный сигнал активации SOS-ответа спустя 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации. Зеленые столбцы обозначают антибиотики, активирующие SOS-ответ, черные – антибиотики, воздействующие на рибосому. В – значения OD_{600} через 5 ч (слева) и 24 ч (справа) инкубации

вающих остановку рибосом, и 50 образцов, активирующих SOS-ответ. Это наблюдение подразумевает сложность состава экстрактов с относительно низким содержанием ингибирующих компонентов, которые не способны преодолеть пробиотическое действие, но все же обнаруживаются репортерной системой. Таким образом, умеренная антибактериальная активность с неустановленным механизмом действия обнаружена у 4% образцов Сахалинской коллекции, а пробиотическая активность обнаружена в 93% экстрактов. Фракционирование культуральных жидкостей может привести к выявлению дополнительных компонентов с антибактериальной активностью.

Коллекция дрожжей с Камчатки содержит более 2500 образцов. Мы протестировали 559 образцов, 482 из которых подавляли рост бактериальных клеток, 41 образец стимулировал его, а 36 не оказывали никакого эффекта (рис. 3).

Мы обнаружили два образца, индуцирующих экспрессию *Katushka2S*, 46 образцов, стимулирующих экспрессию RFP, и один образец, активирующий оба репортерных сигнала, одновременно с подавлением роста клеток. Оба индуктора *Katushka2S* продемонстрировали снижение сигнала RFP, а все 46 образцов, увеличивающих сигнал SOS-ответа, снизили сигнал репортера ингибирования трансляции. Можно предположить, что эти экстракты могут со-

держат вещества, тормозящие рибосомы и влияющие на ДНК соответственно. Образец, стимулирующий экспрессию обоих репортерных белков, имеет профиль, напоминающий антибиотики, останавливающие рибосомы, а не индуцирующие SOS-ответ.

В группе ингибиторов роста клеток 471 образец снизил сигнал *Katushka2S* ниже базового уровня. Около половины из них, 213 экстрактов, привели к экспрессии RFP на базовом уровне. Аналогичные эффекты наблюдали в присутствии ингибиторов трансляции, которые не приводят к остановке рибосомы (рис. 1). Восемь образцов ингибировали рост клеток, не влияя на сигнал *Katushka2S* и снижая сигнал RFP, подобно некоторым концентрациям неомицина и тетрациклина. Это может указывать на присутствие в культуральных жидкостях ингибитора, который не вызывает SOS-ответ, механизм действия которого может быть связан с нарушением трансляции.

Среди экстрактов, стимулирующих рост клеток, мы обнаружили 21 образец, вызывающий остановку рибосом, и 30 образцов, активирующих SOS-ответ. Найден также один образец, активирующий SOS-ответ, который не подавлял рост клеток. Потенциально эти экстракты могут содержать антибактериальные компоненты в низких концентрациях.

Таким образом, в отличие от Сахалинской коллекции, только 7% протестированной Камчатской коллекции показали пробиотическую активность. Антибактериальное действие разной степени интенсивности проявили 86% образцов, при этом ряд экстрактов вызвал активацию SOS-ответа и остановку рибосом.

Следует отметить, что большинство ингибирующих экстрактов имели схожий профиль репортерных сигналов со значительным снижением экспрессии *Katushka2S* и уровнем RFP, близким к фоновому. Подобное поведение продемонстрировали ингибиторы трансляции, не вызывающие остановку рибосом. По-видимому, это может быть возможным механизмом ингибирования, свойственным дрожжевым экстрактам.

Среди всех изученных образцов выраженными антибактериальными свойствами (снижение OD_{600} бактериальной культуры более чем в 2 раза относительно контроля) обладали 44 образца коллекции Камчатки. Места сбора образцов на Камчатке были выбраны таким образом, чтобы в непосредственной близости от них находились грязевые, водные или газовые выбросы: поселки Паужетка, Озерновский, Мутновский, Эссо и их окрестности; территории вблизи сопки Скалистой и Курильского озера. При этом 28 из 44 изолятов были обнаруже-

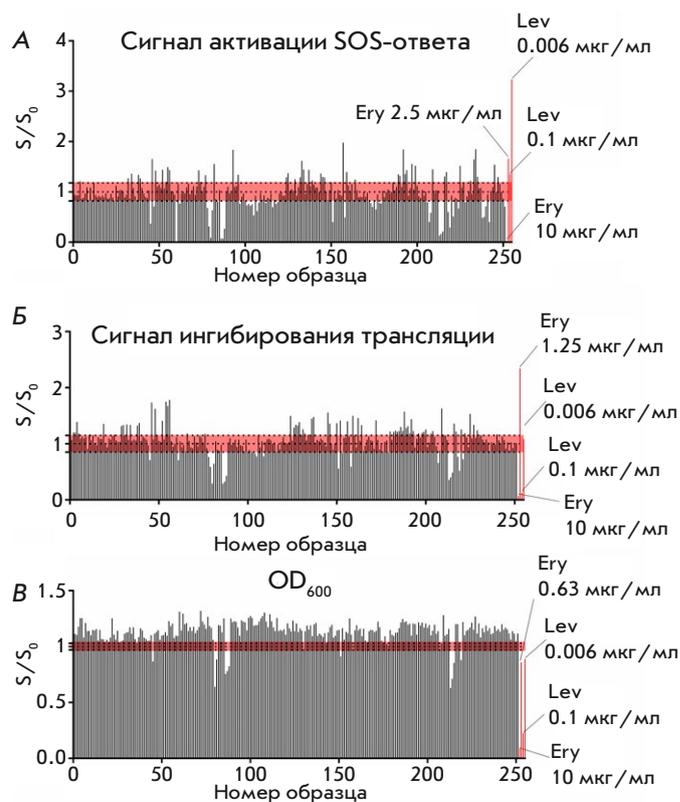


Рис. 2. Анализ антибактериальной активности Сахалинской коллекции дрожжей с помощью репортерной системы. По вертикальной оси отложены значения S/S_0 , где S – значения флуоресценции репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца через 24 ч инкубации. По горизонтальной оси отложены порядковые номера образцов. В качестве положительных контролей приведены данные для эритромицина (Ery, 10, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл), левофлоксацина (Lev, 0.1, 0.006 мкг/мл). Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал активации SOS-ответа. Б – репортерный сигнал ингибирования трансляции. В – значения OD_{600}

ны в ущелье, удаленном на расстояние около 200 м от Паужетской геотермальной электростанции: 11 – на татарнике (*Onopordum acanthium*) и 17 – на полыни (*Artemisia vulgaris*).

В данном ущелье собирали также спорыш, мятлик луговой, водосбор, веронику и др., однако дрожжевые изоляты, живущие на них, не проявляли ярких антибактериальных свойств. Полынь и татарник собирали и на других территориях: полынь – в бухте Тихой Курильского озера (один изолят с выраженными антибактериальными свойствами), на побережье Охотского моря в окрестностях п. Озерновский, на равнинных территориях вблизи п. Паужетка, на склонах сопки Скалистой (нет изо-

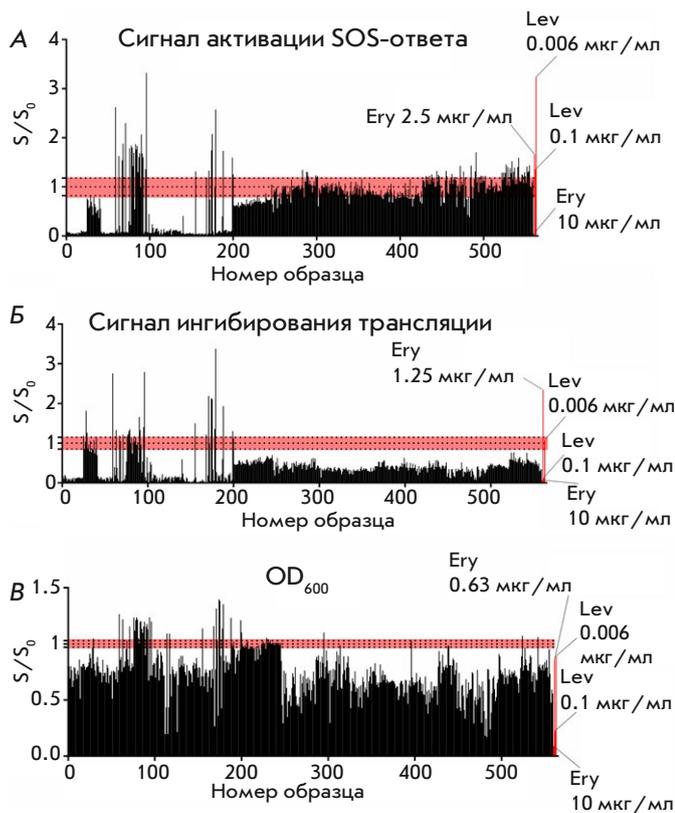


Рис. 3. Анализ антибактериальной активности коллекции дрожжей Камчатки с помощью репортерной системы. По вертикальной оси отложены значения отношения S/S_0 , где S – значения флуоресцентного репортерного сигнала или OD_{600} в присутствии образца, S_0 – без образца через 24 ч инкубации. По горизонтальной оси отложены порядковые номера образцов. В качестве положительных контролей приведены данные для эритромицина (Ery, 10, 2.5, 1.25, 0.6 мкг/мл), левофлоксацина (Lev, 0.1, 0.006 мкг/мл). Красная область показывает диапазон фоновых значений. А – репортерный сигнал активации SOS-ответа. Б – репортерный сигнал ингибирования трансляции. В – значения OD_{600}

лятов с выраженными антибактериальными свойствами); татарник – в бухте Тихой Курильского озера, на склонах сопки Скалистой (нет изолятов с выраженными антибактериальными свойствами), на равнинных территориях вблизи п. Мутновский (один изолят с выраженными антибактериальными свойствами).

Культуральные жидкости 43 из 44 изолятов с выраженными антибактериальными свойствами снижали репортерные сигналы ниже контрольного уровня, т.е. не приводили к активации SOS-ответа и остановке рибосом.

Таблица 2. Результаты таксономической идентификации штаммов дрожжей, культуральные жидкости которых проявили антибактериальные свойства

Коллекционный номер штамма	Видовая принадлежность штамма / соответствующий номер последовательности в BLAST
KI-1-1	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-3-6a	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-19-1a	<i>Candida parapsilosis</i> / KT282393.1
KI-174-4a	<i>Candida parapsilosis</i> / KT282393.1
KI-17-5-1a	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> / MN006694.1
KI-18-1a	<i>Naganishia diffluens</i> / MK793259.1, MT303133.1
KI-53-1-6r	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1
KI-80-1	<i>Naganishia liquefaciens</i> / MG722803.1
KI-81-2-1	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-55-1-1**	<i>Naganishia diffluens</i> / MK793259.1, MT303133.1
KI-46-5в-2	<i>Naganishia albidosimilis</i> / MW248429.1, MT127371.1
KI-31-3	<i>Naganishia albidosimilis</i> / MW248429.1, MT127371.1
KI-39-5	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-151-0	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-223-16	<i>Naganishia vishniacii</i> / OM337523.1
KI-193-3	<i>Cryptococcus adeliensis</i> / JX188117.1, JX188114.1
KI-55-1-9-1	<i>Naganishia albidosimilis</i> / LC203701.1, LC203699.1, MW248429.1
KI-55-1-9-3*	<i>Naganishia albidosimilis</i> / LC203701.1, LC203699.1, MW248429.1
KI-53-1-13a*	<i>Naganishia adeliensis</i> / JX188117.1, JX188114.1, LC202041.1

Таксономическая идентификация

Мы выбрали 19 штаммов, культуральные жидкости которых подавляли рост клеток с соотношением S/S_0 в диапазоне 0.17–0.97. Наибольшие ингибирующие свойства проявили три образца (с коллекционными номерами KI-55-1-9-1, KI-55-1-9-3* и KI-53-1-13a*), их значения S/S_0 находились в интервале 0.17–0.29. Четыре образца (номера KI-1-1, KI-3-6a, KI-19-1a и KI-31-3) привели к увеличению репортерного сигнала активации SOS-ответа.

Показано, что данная группа представлена преимущественно дрожжами рода *Cryptococcus*

(*Naganishia*) (табл. 2). Видовое разнообразие было следующим: пять штаммов – *Cryptococcus adeliensis*, четыре – *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis*, два – *Naganishia (Cryptococcus) diffluens*, один – *Naganishia (Cryptococcus) liquefaciens*, четыре – *Naganishia (Cryptococcus) vishniacii*, два – *Candida parapsilosis*, один – *Rhodotorula mucilaginosa*.

Дрожжевые изоляты KI-55-1-9-1, KI-55-1-9-3* и KI-53-1-13a* с наиболее выраженными ингибиторными свойствами принадлежали видам *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis* и *Naganishia (Cryptococcus) adeliensis*. Штаммы KI-1-1, KI-3-6a, KI-19-1a и KI-31-3, культуральные жидкости которых стимулировали SOS-ответ, были представителями видов *Naganishia (Cryptococcus) albidosimilis*, *Naganishia (Cryptococcus) adeliensis* и *Candida parapsilosis*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Современные темпы вымирания видов примерно в 100–1000 раз выше, чем за последние столетия [32]. Продолжающаяся потеря биоразнообразия приводит к исчезновению по крайней мере одной важной биоактивной молекулы каждые 2 года [33]. Обнаружение и хранение биоматериалов с последующей организацией коллекций видов, а затем исследование этих коллекций способствуют сохранению биоразнообразия [2, 3].

В данной работе мы проанализировали антибактериальную активность штаммов дрожжей, обнаруженных на полуострове Камчатка и острове Сахалин, в отношении бактериальных репортерных клеток *E. coli ΔtolC*. Отсутствие гена *tolC* повысило чувствительность анализа [9, 34] за счет увеличения концентрации малых молекул в клетке, что предпочтительно для многокомпонентных неочищенных природных экстрактов с потенциально низким содержанием биологически активных соединений.

Высокопроизводительный скрининг биоактивных веществ обычно проводится на газоне бактерий с использованием агаризованных сред [35]. Однако бактериальные культуры, растущие на твердых средах и в жидкости, метаболически различаются. В протеоме одной колонии *E. coli*, культивируемой в двух условиях, выявлено перекрытие только 68% белков [36]. Таким образом, несмотря на широкое использование двойной флуоресцентной репортерной системы на твердой среде [9], было необходимо валидировать применение данной системы в жидкой среде с помощью набора известных антибиотиков. Примечательно, что активаторы SOS-ответа продемонстрировали колоссальное увеличение флуоресценции RFP после 5 ч инкубации с бакте-

риальными клетками, тогда как разделение ингибиторов трансляции на индукторы останова рибосом и ошибочного декодирования стало возможным только после 24 ч. В целом, наши результаты соответствуют ранее полученным данным [9], что доказывает применимость системы в жидкости.

Текущая модификация анализа имеет ряд преимуществ. Во-первых, она позволяет контролировать плотность культуры клеток путем измерения OD_{600} с последующим выводом о пробиотических или антибактериальных качествах образца. Кроме того, она обеспечивает возможность добавления тестируемого вещества на разных фазах роста бактерий. Это может быть значимым, поскольку чувствительность бактерий к антибиотикам зависит от метаболического состояния клетки [37]. Во-вторых, она позволяет регистрировать как увеличение, так и уменьшение репортерных сигналов относительно контрольного уровня. Снижение уровня флуоресценции, сопровождающееся снижением OD_{600} , может указывать на гибель клетки, тогда как снижение уровня флуоресценции с увеличением OD_{600} по сравнению со стартовыми значениями может указывать на глубокие изменения в клеточном метаболизме [24]. В-третьих, на агаризованной среде, когда исследуемый образец контактирует со средой, начинается гонка «лекарство–бактерия» (drug–bug) [35]. Молекулы образца диффундируют в агаре, создавая динамически изменяющийся градиент концентраций, в то время как рост бактерий прогрессирует по направлению градиента. Результатом является конкуренция скорости роста клеток и скорости диффузии исследуемого вещества. В случае образцов с низкими биоактивными концентрациями этот эффект может ухудшить анализ. В то же время методика определения антибактериальной активности в жидкой среде имеет ряд недостатков, таких как более длительное время обработки, большее количество расходных материалов и невозможность анализа плохо растворимых веществ.

Мы проанализировали антибактериальные свойства коллекции дрожжей и сравнили данные, полученные для образцов с Сахалина и Камчатки. Интересно, что в Сахалинских образцах не обнаружили значимых антимикробных свойств; напротив, они были преимущественно пробиотиками. Штаммы Камчатки показали сильные антибактериальные свойства, некоторые из них активировали репортерные сигналы в тест-системе. Однако 43 из 44 изолятов с наиболее выраженными антибактериальными свойствами не приводили к активации SOS-ответа и останова рибосом, позволяя предположить, что выделяемые ими биоактивные

вещества могут нарушать целостность бактериальной мембраны или подавлять способность бактерий образовывать биопленки [38]. Поскольку в данном исследовании культуральные жидкости были получены неразрушающим способом по отношению к дрожжевым клеткам, то, вероятнее всего, дикие дрожжи могут выделять обнаруженные биологически активные метаболиты во внеклеточное пространство.

Таксономическая идентификация штаммов дрожжей показала, что изоляты с наиболее сильными антимикробными свойствами принадлежат к роду *Naganishia* (*Cryptococcus*). Это согласуется с предыдущими сообщениями о токсичности представителей рода *Naganishia* (*Cryptococcus*), обитающих в различных географических зонах. Виды *Naganishia albida* и *Naganishia diffluens*, обнаруженные в районе щелочного озера Вади-эль-Натрун, Египет, обладали антибактериальной активностью против *E. coli* и *Staphylococcus capitis* [39], а вероятная патогенность штаммов *Naganishia adeliensis* в отношении живых организмов и продукция ими вторичных метаболитов, включая микотоксины, зарегистрированы у дрожжей, обнаруженных в окрестностях Лодзи, Польша [40].

Оказалось, что более половины штаммов с выраженными антибактериальными свойствами были найдены в ущелье рядом с Паужетской геотермальной электростанцией на татарнике и полыни. Причем именно совокупность растений и места их произрастания приводили к появлению антибактериальных качеств у культуральных жидкостей дрожжей. Ущелье вблизи п. Паужетка является биотопом, где сочетаются повышенная влажность, низкая освещенность и нагрев почвы термальными источниками. Такие условия обеспечивают значительное биоразнообразие микроорганизмов. При этом известно, что дрожжи способны защищать растение-хозяина от микопатогенов, прикрепляясь к поверхности грибов и секретировав ферменты, которые разрушают их клеточные стенки [38]. В случае высокой конкуренции концентрация данных дрожжевых ферментов может быть увеличена и может разрушать также и мембраны бактерий. При этом полынь и татарник содержат биоактивные сесквитерпеновые лактоны [41, 42], обладающие антимикотическими свойствами [43]. Комфортные условия окружающей среды могли побудить клетки дрожжей развить устойчивость к данным соединениям, например, с помощью синтеза ферментов, способных модифицировать се-

сквитерпеновые лактоны до безопасной формы, либо синтезируя низкомолекулярные компоненты, нарушающие биосинтез сесквитерпеновых лактонов. Эти биоактивные соединения могли бы также оказывать негативное воздействие на бактериальные клетки. Известно, что растения с антибактериальной активностью «культивируют» мутуалистическую микрофлору, которая обладает схожей биоактивностью. К примеру, антибактериальный потенциал кожуры граната может определяться не только содержанием собственных компонентов, но также и микрофлорой, в частности, местными дрожжами [44].

Истинные механизмы антибактериального действия культуральных жидкостей штаммов коллекции предстоит определить после выделения и идентификации активных компонентов, однако уникальность обнаруженного биоценоза не вызывает сомнений и может стать ориентиром для схожих экспедиций. Исследователи отмечают необходимость анализа взаимодействия не только внутри отдельных групп микроорганизмов – бактерий с бактериями или дрожжей с дрожжами, но и взаимодействий между группами для более глубокого понимания их функционирования и влияния на окружающую среду [45]. Наша работа вносит вклад в изучение взаимодействий микробных сообществ в рамках определенных биоценозов, подчеркивая важность комплексного подхода к поиску биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы выявлены штаммы коллекции дрожжей, проявляющие антибактериальные и пробиотические свойства, что подтверждает ценность уникальной Дальневосточной коллекции и демонстрирует необходимость сохранения и изучения биоразнообразия. ●

*Работа поддержана грантом Российского
научного фонда (№ 22-14-00278).*

*Благодарности. Авторы выражают
благодарность научной группе П.В. Сергиева
(МГУ) за любезно предоставленный
бактериальный штамм с двойным
флуоресцентным репортером, С.А. Булату
за консультацию по таксономической
идентификации дрожжей и Я.А. Пуцниной
за помощь в анализе антибактериальной
активности коллекции дрожжей.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seal B.S., Lillehoj H.S., Donovan D.M., Gay C.G. // *Animal Hlth Res. Rev.* 2013. V. 14. № 1. P. 78–87.
2. Beutler J.A. // *Curr. Protocols Pharmacol.* 2009. V. 46. P. 9.11.1–9.11.21.
3. Neergheen-Bhujun V., Awan A.T., Baran Y., Bunnefeld N., Chan K., Dela Cruz T.E., Egamberdieva D., Elsässer S., Johnson M.V., Komai S., et al. // *J. Global Hlth.* 2017. V. 7. № 2. P. 020304.
4. Tao Z., Yuan H., Liu M., Liu Q., Zhang S., Liu H., Jiang Y., Huang D., Wang T. // *J. Microbial. Biotechnol.* 2023. V. 33. № 2. P. 151–166.
5. Aly A.H., Debbab A., Proksch P. // *Fungal Diversity.* 2011. V. 50. P. 3–19.
6. Younis G., Awad A., Dawod R.E., Yousef N.E. // *Veterinary World.* 2017. V. 10. № 8. P. 979–983.
7. Deveau A., Bonito G., Uehling J., Paoletti M., Becker M., Bindschedler S., Hacquard S., Hervé V., Labbé J., Lastovetsky O.A., et al. // *FEMS Microbial. Rev.* 2018. V. 42. № 3. P. 335–352.
8. Gut A.M., Vasiljevic T., Yeager T., Donkor O.N. // *Microbiology.* 2018. V. 164. № 11. P. 1327–1344.
9. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
10. Liu S., Wang T., Lu Q., Li F., Wu G., Jiang Z., Habden X., Liu L., Zhang X., Lukianov D.A., et al. // *Front. Microbial.* 2021. V. 12. P. 604999.
11. Liu S.W., Jadamba N., Nikandrova A.A., Osterman I.A., Sun C.H. // *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 5. P. 989.
12. Wang T., Li F., Lu Q., Wu G., Jiang Z., Liu S., Habden X., Razumova E.A., Osterman I.A., Sergiev P.V., et al. // *J. Pharmaceut. Anal.* 2021. V. 11. № 2. P. 241–250.
13. Volynkina I.A., Zakalyukina Y.V., Alferova V.A., Belik A.R., Yagoda D.K., Nikandrova A.A., Buyuklyan Y.A., Udalov A.V., Golovin E.V., Kryakvin M.A., et al. // *Antibiotics.* 2022. V. 11. № 9. P. 1198.
14. Koronakis V., Eswaran J., Hughes C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 467–489.
15. Суслов А.В., Сусллова И.Н., Багиян Г.А., Давыденко С.Г., Степанова В.П., Суханова Е.А., Яровой Б.Ф. // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2004. Т. 44. № 5. С. 574–578.
16. MacDonald P.N. (Ed) *Two-hybrid systems: Methods and protocols methods in molecular biology.* Springer Science & Business Media, 2008. V. 177. 336 p.
17. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (Eds) *Yeasts: Characteristics and identification.* Cambridge Univ. Press, 1983. 811 p.
18. Kreger-van Rij N.J.W. (Ed) *The Yeasts: A taxonomic study.* Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.
19. Полякова А.В., Чернов И.Ю., Паников Н.С. // *Микробиология.* 2001. Т. 70. № 5. С. 714–720.
20. Stepanova V.P., Suslov A.V., Suslova I.N., Sukhanova E.A., Yarovoy B.F., Verbenko V.N. // *Marine Biol. J.* 2020. V. 5. № 3. P. 64–73.
21. Сергиев П.В., Остерман И.А., Головина А.Я., Лаптев И.Г., Плетнев Ф.И., Евфратов С.А., Марусич Е.И., Леонов С.В., Иваненков Я.А., Богданов А.А. и др. // *Биомед. химия.* 2016. Т. 62. № 2. С. 117–123.
22. Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *J. Nat. Prod.* 2017. V. 80. № 3. P. 756–770.
23. Tenson T., Lovmar M., Ehrenberg M. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 330. № 5. P. 1005–1014.
24. Stokes J.M., Lopatkin A.J., Lobritz M.A., Collins J.J. // *Cell Metabolism.* 2019. V. 30. № 2. P. 251–259.
25. Borovinskaya M.A., Shoji S., Fredrick K., Cate J.H. // *RNA.* 2008. V. 14. № 8. P. 1590–1599.
26. Fernandes P. // *Cold Spring Harb. Perspectives Med.* 2016. V. 6. № 1. P. a025437.
27. Chopra I., Roberts M. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 2001. V. 65. № 2. P. 232–260.
28. Aviner R. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 1074–1083.
29. Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000. V. 44. № 12. P. 3249–3256.
30. Fábrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J. // *Microb. Biotechnol.* 2009. V. 2. № 1. P. 40–61.
31. Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. // *Cell.* 2001. V. 104. № 6. P. 901–912.
32. Pimm S.L., Jenkins C.N., Abell R., Brooks T.M., Gittleman J.L., Joppa L.N., Raven P.H., Roberts C.M., Sexton J.O. // *Science.* 2014. V. 344. № 6187. P. 1246752.
33. Pimm S.L., Russell G.J., Gittleman J.L., Brooks T.M. // *Science.* 1995. V. 269. № 5222. P. 347–350.
34. Fan J., de Jonge B.L., MacCormack K., Sriram S., McLaughlin R.E., Plant H., Preston M., Fleming P.R., Albert R., Foulk M., et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014. V. 58. № 12. P. 7264–7272.
35. Audrey W. // *Antimicrobial susceptibility testing protocols / Eds Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A.C.* Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, 2007. P. 53–72.
36. Fortuin S., Nel A.J.M., Blackburn J.M., Soares N.C. // *J. Proteomics.* 2020. V. 228. P. 103929.
37. Lobritz M.A., Belenky P., Porter C.B., Gutierrez A., Yang J.H., Schwarz E.G., Dwyer D.J., Khalil A.S., Collins J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 27. P. 8173–8180.
38. Georgescu A.M., Corbu V.M., Csutak O. // *Curr. Issue. Mol. Boil.* 2024. V. 46. № 5. P. 4721–4750.
39. Sipiczki M., Selim S.A. // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2019. V. 112. № 4. P. 523–541.
40. Wójcik A., Kurnatowski P., Błaszczowska J. // *Internat. J. Occup. Med. Environ. Hlth.* 2013. V. 26. № 3. P. 477–487.
41. Csupor-Löffler B., Zupkó I., Molnár J., Forgo P., Hohmann J. // *Nat. Prod. Commun.* 2014. V. 9. № 3. P. 337–340.
42. Chen X.Y., Liu T., Hu Y.Z., Qiao T.T., Wu X.J., Sun P.H., Qian C.W., Ren Z., Zheng J.X., Wang Y.F. // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 948714.
43. Nawrot J., Adamski Z., Kamińska-Kolat B., Kubisiak-Rzeczyczyk H., Kroma A., Nowak G., Gornowicz-Porowska J. // *Plants.* 2021. V. 10. № 6. P. 1180.
44. Utama G.L., Rahmah S.A., Kayaputri I.L., Balia R.L. // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2022. V. 13. № 1. P. 56–60.
45. Senne de Oliveira Lino F., Bajic D., Vila J.C.C., Sánchez A., Sommer M.O.A. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 1498.