

УДК: 579.66

DOI 10.21661/r-508120

**В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин, Т.А. Калмантаев,**

**К.В. Демушев, И.А. Чукина**

## **АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДНОЙ СУБСТАНЦИИ BACILLUS SUBTILIS ПСФ-19**

*Аннотация:* предмет исследования – штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19, выделенный нами из растительного сырья (препарат «Пассифлора»), который способен продуцировать антимикробное вещество (АМВ), подавляющее патогенные бактерии. В статье рассматриваются способ и условия извлечения из культуральной жидкости фракции АМВ, активного против *Listeria monocytogenes* – одного из опасных кишечных патогенов, инфицирующих пищевые продукты. С помощью биохимических методов и масс-спектропии определена молекулярная масса и установлена пептидная природа активной фракции АМВ. Бактерицидной активностью обладает фракция АМВ с молекулярной массой около 3,4–3,6 кДа, которая разрушается при обработке протеолитическими ферментами, что позволило отнести ее к группе низкомолекулярных антимикробных пептидов – бактериоцинам.

Проведенные исследования позволяют рассматривать штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19 в качестве продуцента бактериоцина, особенно эффективного против возбудителей кишечных листериозов. Установление факта разрушаемости протеолитическими ферментами, нахождение условий микробиологического синтеза АМВ, его выделения и накопления для исследований, предоставляют возможности практического использования в качестве средства для деконтаминации среды обитания взамен традиционным антибиотикам.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, кишечные патогены, бактериоцины, выделение, хроматография, электрофорез, масс-спектрометрия, антимикробные свойства.

*V.D. Pokhilenko, V.V Perelygin, T.A. Kalmantaev,*

*K.V. Detushev, I.A. Chukina*

## **ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF THE PEPTIDE SUBSTANCE BACILLUS SUBTILIS PSF-19**

***Abstract:** the subject of the study is a strain of *Bacillus subtilis* PSF-19 isolated by us from vegetable raw materials (*Passiflora* preparation), which is capable of producing antimicrobial substance (AMV) suppressing pathogenic bacteria. The article discusses the method and conditions of extraction from the culture fluid fraction of AMV, active against *Listeria monocytogenes* – one of the dangerous intestinal pathogens that infect food. Using biochemical methods and mass spectroscopy, the molecular weight and the peptide nature of the active fraction of AMV were determined. A fraction of AMV with a molecular weight of 3,4–3,6 kDa has bactericidal activity, which is destroyed by treatment with proteolytic enzymes, which allowed it to be attributed to the group of low-molecular antimicrobial peptides – bacteriocins.*

*The studies allow to consider the strain *Bacillus subtilis* PSF-19 as a producer of bacteriocin, especially effective against pathogens of intestinal listeriosis. The establishment of the fact of destructibility of proteolytic enzymes, finding the conditions of microbiological synthesis of AMV, its isolation and accumulation for research, provide opportunities for practical use as a means for decontamination of the environment instead of traditional antibiotics.*

***Keywords:** microorganisms, intestinal pathogens, bacteriocins, isolation, chromatography, electrophoresis, mass spectrometry, antimicrobial properties.*

На сегодняшний день, чем чаще мы прибегаем к помощи антибиотикам, тем больше шансов у микробов выработать к ним устойчивость [1]. В связи с ростом лекарственной устойчивости микрофлоры всему обществу как никогда ранее необходимы новые подходы в борьбе с распространением микроорганизмов в среде обитания и терапии инфекционных заболеваний. Одним из таких подходов является использование веществ природного происхождения – бактериоцинов и подобным им соединениям, которые способны более эффективно

убивать бактерии, в том числе и резистентные к антибиотикам [1; 2]. Поэтому разработка новых средств, альтернативных традиционным антибиотикам, является актуальным направлением исследований.

Бактерии – практически неисчерпаемый источник получения многих жизненно важных субстанций, в том числе и целого ряда хорошо известных антимикробных веществ (АМВ). При скрининге и отборе природных штаммов для использования в качестве продуцентов биологически активных веществ в первую очередь обращают внимание на их безвредность для человека и животных, отсутствие «островков» патогенности, энтеротоксина и «рвотного фактора» в их геноме [3; 4]. К числу «практически безопасных» бацилл по международному статусу GRAS (Generally recognized as safe) относят *Bacillus subtilis* и поэтому они служат основой наиболее распространенных в ветеринарии пробиотиков и других биопрепаратов [5]. Нами из биодобавки препарата растительного происхождения «Пассифлора» в марте 2019 года была выделена спороформирующая антагонистически активная бацилла, идентифицированная как *Bacillus subtilis*. Поскольку отличительной ее особенностью было накопление АМВ в среде роста, ранее не встречавшегося у других доступных нам изолятов этого вида, штамм был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» как *Bacillus subtilis* ПСФ-19.

Цель исследования – определение условий получения и выделения антимикробной субстанции, продуцируемой штаммом *B. subtilis* ПСФ-19, изучение ее природы и возможности практического использования.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями (на 2016–2020 гг.)», НИР 059 «Разработка технологии инкапсулирования и контролируемого высвобождения антимикробных субстанций для борьбы с опасными патогенами человека».

### *Материалы и методики исследования*

*Объект исследования.* В работе использовали штамм ПФС-19, выделенный из биодобавки на основе растения пассифлора (син. «кавалерская звезда», «страстоцвет»), который по совокупности морфокультуральных, биохимических свойств и данных масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) идентифицирован как *B. subtilis*. Штамм хранится в «ГКПМ – Оболенск» (регистрационный № В-8711).

*Питательные среды и условия культивирования.* Размножение клеток штамма осуществлялось на питательном агаре Nutrient Agar M001 (HiMedia, Индия), либо ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск, Россия) при 37°C в течение суток. При глубинном культивировании одиночные типовые колонии штамма переносили в пробирку со стерильным изотоническим раствором хлорида натрия (физиологический раствор) и суспендировали с использованием встряхивателя BioVortex V1 (Biosan, Латвия), ориентируясь на получение  $3 \times 10^8$  клеток в единице объёма, что соответствует бактериальному стандарту мутности №1 по МакФарланду. Микробной взвесью (1%, объем/объем) засеивались 750 мл качалочные колбы со 100 мл стерильного ГРМ-бульона (Оболенск, Россия) с добавками (г/л): дрожжевого экстракта – 5,0; калия фосфата двузамещенного трехводного – 3,0; магния сульфата – 0,1; сахарозы – 10,0 (рН 7,3–7,5). Инкубация посевов проводилась при 36–37 °С в термостатируемой качалке (New Brunswick Scientific, США) при  $130 \pm 10$  об/мин в течение 24 часов. В процессе инкубации отбирались пробы культуральной жидкости (КЖ), в которых определялась антимикробная активность. После завершения культивирования проводилось выделение АМВ из проб КЖ.

*Метод выделения антимикробного вещества.* Пробы КЖ разделяли центрифугированием (5000 об./мин), а бесклеточные супернатанты штамма *B. subtilis* ПФС-19 (далее BS) концентрировали в 5–10 раз упариванием под вакуумом при температуре 50–60 °С на лабораторном ротационном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия). Далее по 35 мл концентратов супернатантов смешивали с 8,8 мл н-бутанола (1/4 часть от объема) и гомогенизировали в течение 15

мин, после чего их помещали в холодильник на ночь для разделения фаз. Отбирали верхний прозрачный слой желтоватого цвета, содержащий биологически активный материал в бутанольной фракции, который помещали в предварительно взвешенные чашечки из нержавеющей стали и высушивали в шкафу при температуре 105 °С до полного удаления растворителя. Полученные преципитаты грубых образцов АМВ BS использовались для проведения тонкослойной хроматографии и электрофореза с целью частичной очистки, определения молекулярной массы и наличия бактерицидной активности среди выделенных фракций.

*Метод оценки антимикробной активности.* Пробы культуральной жидкости осаждались в микроцентрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия), освобождались от клеток и по 10 мкл наносились на свежесезанные газоны тест-штамма 766 *Listeria monocytogenes*. Антимикробная активность выражалась в арбитражных единицах (АЕ), отнесенных к 1 мл пробы: 1 АЕ соответствовала максимальному разведению, при котором четко просматривалась зона отсутствия роста тест-штамма. По такому же принципу оценивали наличие и величину антимикробной активности у проб АМВ BS.

*Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)* проводилась в системе хлороформ/метанол/вода – 60:25:4 на пластинах НРТLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия). Фракция, обладающая бактерицидной активностью, отбиралась методом препаративной хроматографии. Для этого по 100 мкл образцов наносили полосой на стартовую линию пластины для ТСХ, которую помещали в систему вышеуказанных растворителей. Пробы, экстрагированные из хроматографической пластины, использованы для электрофоретического разделения и масс-спектрометрии.

*Трис-трицин ПААГ-электрофорез.* Определение молекулярной массы проводилась с помощью метода электрофореза в системе Tris-tricine с додецилсульфатом натрия (ДСН/SDS) на полиакриламидном геле (ПААГ/PAG) в камере SE 260 (Hofer, США) по Shagger [6]. В качестве маркера молекулярной массы использовалась стандартная смесь пептидов (3,4–100 кДа) PageRuler™Low

Range (Thermo Scientific, Литва). Концентрация разделяющего геля – 18%, центрирующего – 9,9%. После завершения электрофореза проводилось биотестирование гелевой пластины. Для этого ее после промывки стерильной водой помещали в чашку Петри, заливали агаровой суспензией (36–40 °С) тестового штамма *L. monocytogenes* 766, а чашку после застывания агара инкубировали при 36–40 °С в течение 18–20 ч. Положительным результатом биотестирования было подавление роста листерий от конкретной, электро-форетически разнесенной по треку полосы с известной молекулярной массой, в которой присутствовало диффундирующее в агар активное вещество.

*Масс-спектрометрия.* Для установления более точного значения молекулярной массы использовался метод время пролётной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Для этого 1,0 мкл пробы, содержащего пептидный экстракт антимикробного вещества, наносили на лунку MSP-чипа и после высыхания образец покрывали 1,0 мкл раствора матрицы ( $\alpha$ -циано-4- гидроксикоричной кислоты, растворенной в водном растворе 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты) [7]. Пептидные масс-спектры получали с использованием масс-спектрометра Microflex LRF MALDI-TOF (Bruker, США) в линейном режиме, используя диапазон масс от 500 до 5000 Да. Перед каждым запуском прибор калибровался с использованием Bruker Bacterial Test Standard, содержащего экстракт белков штамма DH5 $\alpha$  *E. coli* с добавлением двух высокомолекулярных белков РНКазы А и миоглобина [8].

#### *Результаты исследования и обсуждение*

Для проведения препаративной ТСХ по 100 мкл образцов AMB BS наносили полосой на стартовую линию пластины HPTLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> и для осуществления процесса хроматографии ее помещали в камеру со смесью хлороформ/метанол/вода. Для маркировки мест расположения полос пластины после хроматографии просматривали под УФ<sub>254</sub>, что было необходимо для последующего извлечения и биотестирования проб. Результаты проведения указанной процедуры и тестирования полученных проб представлены на рис. 1.

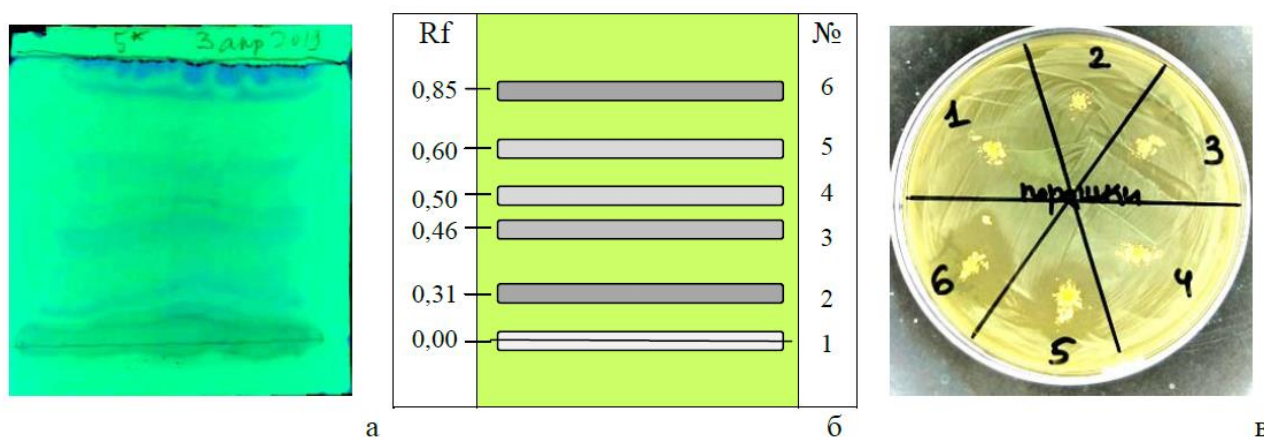


Рис. 1. Препаративная тонкослойная хроматография образца AMB BS, нанесенного полосой на пластину силикагеля

Параметры проведения: объем образца – 100 мкл, система растворителей – хлороформ: метанол: вода (60:25:4); а) пластина после разгона образца, просмотренная в УФ<sub>254</sub>, б) та же пластина, маркированная для отбора проб №1–6 (представлена схематически), в) активность проб силикагеля (№1–6), нанесенных на свежеприготовленный газон тестовой культуры *L. monocytogenes* 766: пробы отобраны по всем позициям от стартовой – №1, до финишной линии – №6 в конечной части пластины.

Образец AMB BS в процессе тонкослойной хроматографии, как следует из анализа рис. 1, сепарируется на различные зоны удержания веществ сорбентом (показатель Rf), что выявляется при освещении пластины УФ (а). Вместе с тем только фракция с показателем Rf = 0,8–0,9 (верхняя часть пластины) обладала реальной антимикробной активностью (пробы №5–6, фото б и в). На этом основании был сделан вывод о том, что лишь фракция с Rf = 0,8–0,9 содержат бактерицидное вещество, способное ингибировать рост клеток патогенного штамма *L. monocytogenes* 766.

Для получения представительного количества этой фракции отбор силикагеля производился по всей ширине пластины в областях расположения маркеров №5–6. Собранный силикагель был экстрагирован в 1 мл деионизованной воды и затем удален из смеси центрифугированием (13000 об/мин). В результате мы получили прозрачный раствор с бактерицидной активностью – объект дальнейшего исследования.

Результаты электрофореза с биотестированием, приведенные на рис. 2, четко указывают на низкомолекулярную природу АМВ BS.

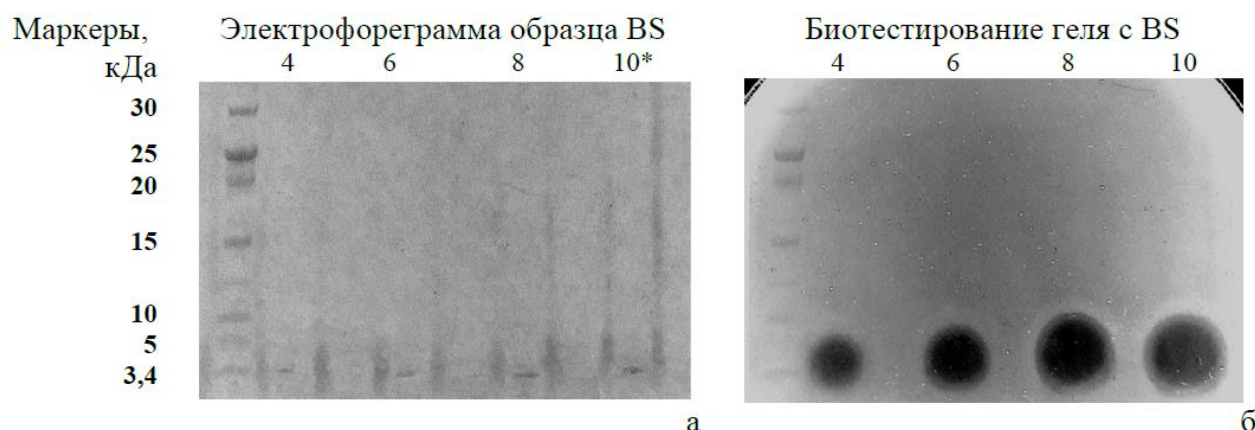


Рис. 2. Электрофоретическое исследование грубого образца АМВ BS, частично очищенного методом ВЭТСХ с последующим биотестированием

Электрофорез проводили в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%) с пептидными маркерами PageRuler™ Low Range; а – ПААГ с пробами BS после окраски Coomassie brilliant blue G250; б – ПААГ, дополнительно залитый агаровой взвесью *L. monocytogenes* 766; (\*) – объемы проб (мкл) образца в лунках ПААГ.

Так, из данных рис. 2 следует, что зоны ингибирования роста листерий расположены между маркерами 3,4 и 5 кДа, то есть в местах, где дислоцированы «пятна» бактериоцина BS. После инкубации четко видны зоны подавления роста тест-штамма в лунках с 4, 6, 8 и 10 мкл BS. При этом диаметр зон ингибирования увеличивается пропорционально количеству АМВ.

Масс-спектрометрический анализ образца АМВ BS по результатам MALDI-TOF показал преимущественное содержание в нем пептида с молекулярной массой 3,4–3,6 кДа, что хорошо видно из результатов изучения его пептидного профиля (рис. 3).



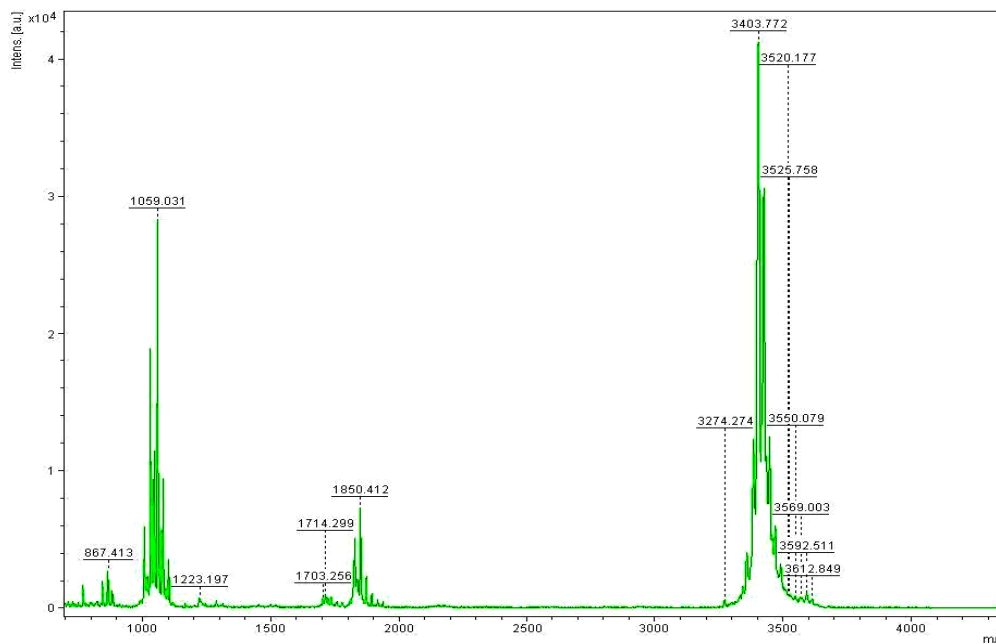


Рис. 3. Определение молекулярного веса и пептидного профиля образца AMB BS по данным MALDI-TOF

Результаты, полученные с использования методов масс-спектрометрии и электрофореза в полиакриламидном геле в сочетании с методом биотестирования, позволяют сделать заключение о том, что лишь пептиды, дающие «пятна» в зоне маркеров 3,4–5 кДа электрофореграммы, проявляли бактериоцидное действие.

Исследование грубого образца с помощью MALDI-TOF дало более точное значение молекулярной массы пептида – 3,4–3,6 кДа (рис. 3). Отметим, что эти значения близки данным Babasaki et al., описавшие в 1985 году «субтилозин А» – новый бактериоцин, продуцируемый штаммом *Bacillus subtilis* 168 [9].

Для уточнения химической природы и принадлежности исследуемого вещества к бактериоцинам активная фракция AMB BS была по отдельности обработана препаратами «Химотрипсин» (10 мг/мл) и «Панзинорм форте» (10 мг/мл), содержащие протеолитические ферменты.

Показано, что после 2 ч инкубации при температуре 30 °С бактерицидная активность фракции BS в отношении клеток *L. monocytogenes* была практически подавлена: на 100% при использовании «Панзинорм форте» и на 88% от химотрипсина. Эти данные подтверждает пептидную природу антимикробного

вещества, продуцируемого авторским штаммом *Bacillus subtilis* ПСФ-19, и его принадлежность к бактериоцинам.

*Заключение.* Новый штамм *Bacillus subtilis* ПСФ-19, выделенный нами из растительного сырья, является продуцентом бактериоцина подобного «субтилозину А», впервые обнаруженного Babasaki et al [9]. Бактериоцин BS ингибирует рост грамположительных микроорганизмов, разрушается протеазами и может рассматриваться как природное средство для борьбы с бактериальными патогенами.

### **Список литературы**

1. Похиленко В.Д. Как выжить в эпоху лекарственной устойчивости бактерий: монография / В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин. – М.: Русайнс, 2019. – 94 с.

2. Marshall S., Arenas G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology // Electronic Journal of Biotechnology. 2003. Vol. 6, №2. P. 271–284.

3. Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I, Tschäpe H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol. 1997 Mar; 23(6):1089–97.

4. Васильев Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики: научное издание / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: Изд-во НИИЦМиБ УЛГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с. – ISBN: 978–5-905970–10–8.

5. Elshaghabe F.M.F., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C. and Panwar H. () *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. Front. Microbiol. – 2017. – 8:1490 (15 p).

6. Shagger H. Tricine dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // Folia Microbiologica. 1987. №166. P. 368–379.

7. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nöbauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, Hess C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorp-

tion/ionization time of flight mass spectrometry analysis J Med Microbiol. 2010 Mar;59(Pt 3):295–301. DOI: 10.1099/jmm.0.016576–0.

8. Детушев К.В. Сравнение методов прямого нанесения биомассы и белковых экстрактов при идентификации микроорганизмов рода *Listeria* методом MALDI-TOF-типирования / К.В. Детушев, А.Г. Богун, Т.Н. Мухина [и др.] // Бактериология. – 2018. – Т. 3, №3. – С. 28–33.

9. Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y., Kurahashi K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis // J. Biochemistry. 1985. Vol. 98. P. 585–603.

### **References**

1. Pokhilenko, V. D., & Perelygin, V. V. (2019). *Kak vyzhit' v epokhu lekarstvennoi ustoichivosti bakterii: monografiia.*, 94. M.: Rusains.

2. Marshall, S., & Arenas, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003. Vol. 6, 2. R. 271-284.

3. Tschape, H. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 1997 Mar; 23(6):1089-97.

4. Vasil'ev, D. A., Kaldyrkaev, A. I., & Feoktistova, N. A. (2013). *Identifikatsiia bakterii Bacillus cereus na osnove ikh fenotipicheskoi kharakteristiki: nauchnoe izdanie.*, 98. Ul'ianovsk: Izd-vo NIITsMiB UIGSKhA im. P.A. Stolypina.

5. Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. Elshagabee F.M.F.,, and () *Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives.* *Front. Microbiol*.

6. Shagger, H. Tricine dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Folia Microbiologica*. 1987. 166. P. 368-379.

7. Hess, C. Alispahic M, Hummel K, Jandreski-Cvetkovic D, Nobauer K, Razzazi-Fazeli E, Hess M, *Species-specific identification and differentiation of Arcobac-*

ter, Helicobacter and Campylobacter by full-spectral matrix-associated laser desorption. Mar;. doi:10.1099/jmm.0.016576-0.

8. Detushev, K. V., Bogun, A. G., & Mukhina, T. N. (2018). Sravnenie metodov priamogo naneseniia biomassy i belkovykh ekstraktov pri identifikatsii mikroorganizmov roda Listeria metodom MALDI-TOF-tipirovaniia. *Bakteriologiya*, T. 3, 3, 28-33.

9. Babasaki, K., Takao, T., Shimonishi, Y., & Kurahashi, K. , Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by Bacillus subtilis 168: isolation, structural analysis, and biogenesis. *J. Biochemistry*. 1985. Vol. 98. P. 585-603.

---

**Похиленко Виктор Данилович** – д-р техн. наук., ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМ) Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

**Pokhilenko Victor Danilovich** – doctor of engineering sciences, leading research scientist of the Department of biological technologies FBIS “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of Rospotrebnadzor (SRCAMB), Obolensk, Russia.

**Перелыгин Владимир Владимирович** – канд. биол. наук., ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

**Perelygin Vladimir Vladimirovich** – candidate of biological sciences, leading research scientist of the Department of biological technologies FBIS “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of Rospotrebnadzor (SRCAMB), Obolensk, Russia.

**Калмантаев Тимур Ахмерович** – канд. биол. наук., научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

**Kalmantaev Timur Akhmerovich** – candidate of biological sciences, research scientist of the Department of biological technologies FBIS “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of Rospotrebnadzor (SRCAMB), Obolensk, Russia.

**Дегушев Константин Владимирович** – научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

**Detushev Konstantin Vladimirovich** – research scientist at the collection cultures Department FBIS “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of Rospotrebnadzor (SRCAMB), Obolensk, Russia.

**Чукина Ирина Анатольевна** – инженер отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск, Россия.

**Chukina Irina Anatolevna** – engineer at the biological technologies Department FBIS “State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology” of Rospotrebnadzor (SRCAMB), Obolensk, Russia.

---