

ПРОТЕАЗЫ КАК ВЕРОЯТНЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ КОНКУРЕНТНЫХ ОТНОШЕНИЙ СРЕДИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Перельгин В.В., Похиленко В.Д., Левчук В.П., Калмантаев Т.А., Светоч Э.А.
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболensk, e-mail: vpokhil003@yandex.ru

В исследованиях использовали штаммы *Enterococcus mundtii* и *Bacillus lentus*, продуцирующие две разные бактериоциноподобные субстанции (BLIS) – первая действует на Gr(+), вторая на Gr(-) бактерии. Показано, что при совместном выращивании бактерий антагонизма между штаммами не наблюдается. Однако после смешивания фракций BLIS, выделенных из двух штаммов, происходила утрата активности полученного раствора лишь в отношении *Listeria monocytogenes*, сохраняясь к *Escherichia coli* и к другим Gr(-) бактериям. Причиной этому могла быть протеаза, секретируемая штаммом бацилл. Установлено, что протеолитический фермент присутствовал только во фракции BLIS *B. lentus*, наличие которого определялось по гидролизу казеина. Активность протеазы подавлялась при температуре 80 °С и полностью исчезала после добавления специфического ингибитора сериновых протеаз – фенилметилсульфонил фторида (PMSF). Поэтому в термически обработанной смеси BLIS по причине инактивации фермента бактериоцидная активность против *L. monocytogenes* полностью сохранялась. Полученные данные указывают на то, что секретируемая протеаза бацилл штамма *B. lentus* может выступать в роли экзогенного регулятора активности бактериоцинов и других низкомолекулярных пептидов в микробиоценозах.

Ключевые слова: бактерии, антагонизм, протеаза, бактериоцин

PROTEINASES AS PROBABLY FACTORS OF REGULATION OF COMPETITIVE RELATIONS AMONG MICROORGANISMS

Perelygin V.V., Pokhilenko V.D., Levchuk V.P., Kalmantaev T.A., Svetoch E.A.
State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (FBIS SRCAMB),
Obolensk, e-mail: vpokhil003@yandex.ru

The studies used the strains *Enterococcus mundtii* and *Bacillus lentus*, producing two different bacteriocin-like substances (BLIS) – the first acts on Gr(+), the second on Gr(-) bacteria. It is shown that there is no antagonism between the strains when the bacteria are grown together. However, after mixing the BLIS fractions isolated from the two strains, the activity of the resulting solution was lost only in relation to *Listeria monocytogenes*, retained to *Escherichia coli* and to other Gr(-) bacteria. The reason for this could be a protease secreted by a strain of bacilli. It was found that the proteolytic enzyme was present only in the BLIS *B. lentus* fraction, the presence of which was determined by the hydrolysis of casein. The protease activity was suppressed at 80 °C and completely disappeared after the addition of a specific inhibitor of serine proteases, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Therefore, in the thermally treated BLIS mixture due to inactivation of the enzyme, the bacteriocidal activity against *L. monocytogenes* was completely preserved. The obtained data indicate that the secreted protease of bacilli of the *B. lentus* strain can act as an exogenous regulator of the activity of bacteriocins and other low molecular weight peptides in microbiocenoses.

Keywords: bacteria, antagonism, protease, bacteriocin

В последние десятилетия из-за обострившейся в мире проблемы множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов очень актуальны исследования по разработке новых антимикробных средств, лишенных недостатков традиционных антибиотиков. В лечении и профилактике кишечных заболеваний в медицине и ветеринарии все чаще используются комплексные биопрепараты пробиотических бактерий, в том числе продуцентов антимикробных пептидов и протеолитических ферментов. Вместе с тем влияние продуктов биосинтеза пробиотиков на конкурентные отношения в микробиоценозе, на развитие резистентности у патогенов к антимикробным соединениям исследовано не в полной мере [1, 2].

Нами из окружающей среды были выделены новые штаммы *Enterococcus* и *Ba-*

cillus, синтезирующие антимикробные бактериоциноподобные субстанции (BLIS) и другие биологически активные вещества [3, 4]. При этом антимикробные соединения штамма *E. mundtii* ингибируют рост некоторых грамположительных (Gr+) бактерий, а штамма *B. lentus* – в большей части грамотрицательных (Gr-) бактерий.

Создание композиции штаммов, обладающих способностью синтезировать антимикробные вещества, полезные метаболиты и ферменты, является важной научной и практической задачей на пути получения лечебно-профилактических препаратов пробиотической направленности.

Цель исследования: изучение характера и условий взаимодействия BLIS продуцируемых представителями энтерококков – *E. mundtii* и бацилл – *B. lentus*, взятых как

по отдельности, так и в сочетании, в отношении тестовых бактериальных патогенов (Gr+) и (Gr-) природы.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – штаммы *E. mundtii* B-7424, *B. lentus* B-7150, их метаболиты, обладающие антимикробной и протеолитической активностью, а также тестовые штаммы бактериальных патогенов – *Listeria monocytogenes* 766, *Salmonella* Enteritidis rif92 и *Escherichia coli* R3, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск».

Пассирование штамма *E. mundtii* B-7424 осуществляли на питательном агаре (ГРМ-агар, ГНЦ ПМБ, Россия), на MRS-агаре (HiMedia, India) при температуре 36 °С в течение 24 ч. Глубинное культивирование штамма *E. mundtii* проводилось в 10 л ферментере BioFlo 110 (NBS, США) с 5,0 л питательной среды следующего состава (г/л): гидролизат казеина – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; глюкоза – 20,0; натрия цитрат – 5,0; натрия хлорид – 5,0; магния сульфат – 0,5; калий фосфорнокислый 2-зам. – 1,0 (рН среды – 6,8 ед.). Выращивание осуществляли при температуре 36 °С с перемешиванием, аэрацией и рН-стабилизацией (5,9–6,0 ед. рН) в течение 14–16 ч.

Пассирование штамма *Bacillus lentus* B-7150 осуществляли на питательном агаре (ГРМ-агар, ГНЦ ПМБ, Россия) и на Starch Agar (HiMedia, India) при температуре 29–30 °С в течение 36–48 ч. Глубинное культивирование штамма проводилось в 10 л ферментере BioFlo 110 (NBS, США) с 5,0 л питательной среды следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 5,0; глюкоза – 1,5; аммоний виннокислый – 7,0; калий хлористый – 1,0, калий фосфорнокислый 2-зам. – 2,6; глицерин – 1,0; магний сернокислый – 0,1. рН среды 7,2. Выращивание проводили при температуре 29–30 °С в условиях интенсивной аэрации и перемешивания в течение 24–36 ч.

Выделение из культуральной жидкости (КЖ) фракции, ответственной за бактерицидную активность, производилось методом мембранной фильтрации на половолоконном картридже типа AP (Россия, Кириши) с отсеиванием по молекулярному весу в 100 кДа. Бесклеточные фильтраты смешивали с безводным дихлорметаном (ДХМ) в отношении 1:1. Смесь гомогенизировали при помощи миксера (700 об/мин, 5 мин) при комнатной температуре, полученную эмульсию разливали в металлические стаканы и центрифугировали (5000 об/мин, 10 мин) для разделения водной и гидрофобной фаз. Интерфазную пленку, формируемую на границе раздела фаз, извлекали из центрифужного стакана после удаления сначала верхней – водной фазы, а затем нижней фазы – ДХМ. Пленочную массу, включающую грубую BLIS, высушивали конвективно при температуре 60 °С, взвешивали и помещали в герметичный флакон для последующего использования.

Определение бактерицидной активности пленочной массы проводили с использованием свежеприготовленных газонов тест-штаммов путем титрования проб в серии двукратных разведений (спот-тест). Активность пленочной массы, обозначенной далее как фракция BLIS, выражали как АЕ/мл или АЕ/мг. Присутствие в пленочной массе антимикробных пептидов и их молекулярную массу определяли по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (Tris-tricine SDS-PAGE, ПААГ) с использованием мо-

лекулярных маркеров (Page Ruler) и последующего биотестирования выявленных полос, состоящем в наложении на ПААГ питательного агара с *L. monocytogenes* и *E. coli* [3, 4].

Наличие и активность протеаз, присутствующих в составе BLIS, оценивали по размерам зон гидролиза казеина, образующихся после нанесения проб на поверхность молочного агара с различными показателями рН (6-10). Специфичность протеаз и их классификация делались на основе рН-зависимости и чувствительности к ингибитору сериновых протеаз – фенилметилсульфонил фториду (PMSF, Sigma-Aldrich).

Для сравнения использован коммерческий препарат субтилизин (Carlsberg, Sigma-Aldrich) с концентрацией 1 мг/мл, протеолитическая активность которого была принята за 100%. Опыты проведены на агаровой среде с казеином (1%) в чашках Петри.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета BioStat v5 (Analyst Soft, США).

Результаты исследования и их обсуждение

Взаимоотношения штаммов *E. mundtii* и *B. lentus* были исследованы в опытах перекрестного антагонизма при совместном выращивании на плотной питательной среде ГРМ с дрожжевым экстрактом (рис. 1).

Штаммы *E. mundtii* и *B. lentus*, как следует из фотографий (рис. 1, а и б), не проявляют антагонизма в отношении друг друга независимо от того, были ли они выращены на простой (ГРМ), обогащенной (ГРМ-ДЭ) либо специальной (MRS) средах. Использование MRS среды для культивирования бактерий дает возможность вырабатывать клетками органические кислоты и перекись водорода, являющиеся известными природными антисептиками.

Для оценки уровня биосинтеза BLIS штаммы *E. mundtii* и *B. lentus* были выращены в ферментерах, затем пробы КЖ разделены центрифугированием или ультрафильтрацией на биомассу и бесклеточный ферментат. Из ферментата методом межфазного разделения с использованием ДХМ далее выделяли фракции BLIS. В полученных BLIS-EM и BLIS-BL уточняли молекулярные массы, оценивали противомикробную активность, выявляли присутствие протеаз, а также исследовали взаимное влияние компонентов BLIS в смешанных композициях.

При биотестировании ПААГ рост тестовых штаммов *L. monocytogenes* и *E. coli* отсутствовал вокруг полос с молекулярными массами 5–6 кДа и 4 кДа соответственно. При этом полоса на 5–6 кДа соответствует BLIS *B. lentus*, а на 4 кДа – BLIS *E. mundtii*, что полностью совпадает с данными полученными нами ранее [3, 4]. Характерно, что BLIS-EM подавлял рост только грамположительных листерий, а BLIS-BL – преимущественно грамотрицательных бактерий,

в частности, *E. coli* и *Salmonella* Enteritidis. Таким образом, было подтверждено, что исследованные штаммы *E. mundtii* и *B. lentus* являются продуцентами низкомолекулярных бактериоциноподобных пептидов.

Мы предположили, что отсутствие взаимного антагонизма бацилл и энтерококков могло быть связано с наличием в среде факторов, отвечающих за развитие резистентности к бактериоцинам. Таким фактором, учитывая пептидную природу исследуемых бактериоцинов, могли быть протеолитические ферменты в КЖ. В этой связи проведено изучение протеолитической активности фракций BLIS из бесклеточных супернатантов *B. lentus* и *E. mundtii* с использованием 1% казеина в составе агар.

Протеолизная активность исходных образцов BLIS оценивалась после термообработки (+80 °С, 30 мин) и после действия ингибитора PMSF. В качестве контроля использовали коммерческую протеазу – субтилизин (Sigma-Aldrich). Полученные результаты по гидролизу казеина с помощью сериновой протеазы *B. lentus* и субтилизина представлены на рис. 2. Во фракции BLIS-BL действительно присутствует протеаза, сходная по активности с коммерческим ферментом субтилизином (Sub). Активность протеазы из BLIS-BL, так же как и субтилизина, подавлялась под воздействием высокой температуры (80 °С) и в присутствии ингибитора сериновых протеаз – PMSF. Факт подавления протеолитической актив-

ности фракции BLIS-BL в результате обработки ингибитором PMSF и реакция на термообработку свидетельствуют о том, что фермент *B. lentus* с высокой долей вероятности является сериновой протеазой.

Одновременно было отмечено, что фракция BLIS-EM не способна осуществлять гидролиз казеина, следовательно, штамм *E. mundtii* В-7424 не является продуцентом секретируемой протеазы, а производит бактериоцин, чувствительный к действию химотрипсина и действующий на (Гр+) бактерии. Основные функциональные свойства фракций BLIS, вырабатываемых штаммами *B. lentus* и *E. mundtii*, представлены в таблице.

Далее были проведены опыты по изучению возможности протеолитического разрушения бактериоцина BLIS *E. mundtii* в смеси фракций в условиях воздействия ингибитора PMSF и высокой температуры (80 °С). Для этого регидратированные сухие фракции BLIS-EM и BLIS-BL в концентрации 10 мг/мл по отдельности и в смеси (1:1) были разделены на четыре равные части. Все они были подвергнуты 60 минутному воздействию температуры и pH: +30 °С и +80 °С, pH 6 и pH 10 соответственно. Для оценки антимикробного действия обработанные пробы BLIS в объеме по 10 мкл наносили на поверхность свежесейянного газона тестового штамма *L. monocytogenes* в чашке Петри, которые инкубировали при 37 °С в течение 20 ч.

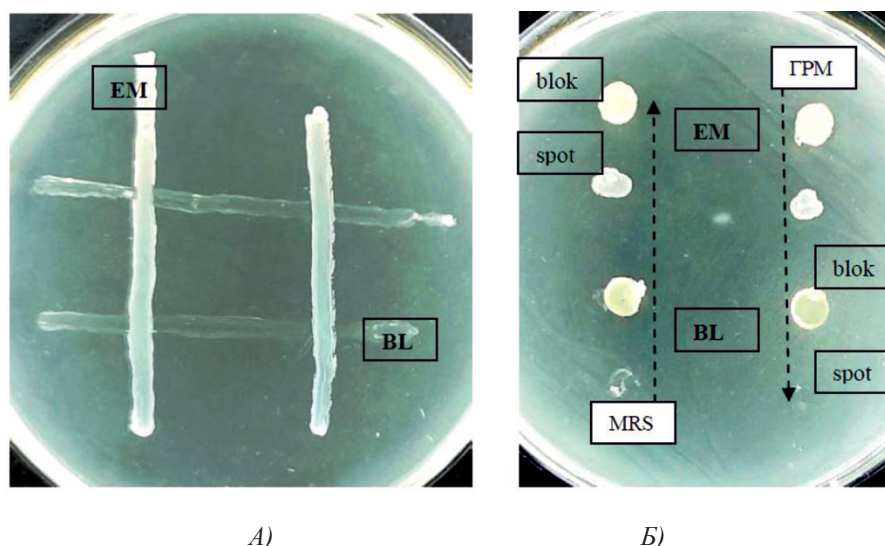


Рис. 1. Исследование взаимного антагонизма штаммов *E. mundtii* и *B. lentus* на ГРМ-агаре методами перпендикулярных штрихов (а) блоков и спотов (б). А – чашка засеяна двумя вертикальными штрихами штамма энтерококков (EM) и перпендикулярно им сделаны два штриха штамма бацилл (BL); учет результатов производился через 24 ч. Б – на свежий газон *B. lentus* нанесены блоки (bloks) и споты (spots) суточных культур *E. mundtii* (EM) и *B. lentus* (BL), выращенных на MRS-агаре (левая вертикаль) и на ГРМ-ДЭ агаре (правая вертикаль)

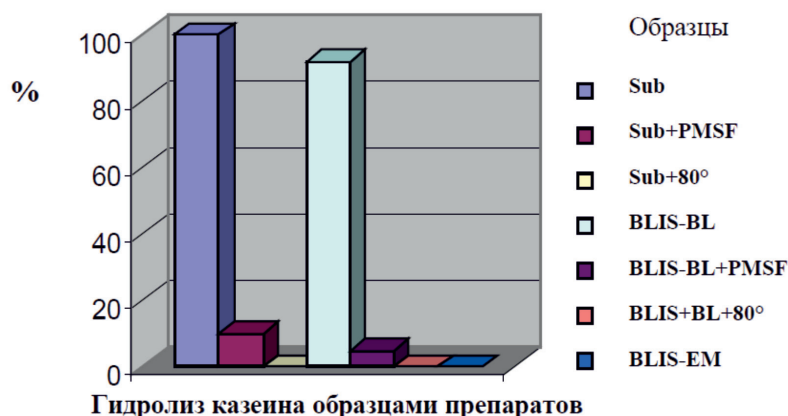


Рис. 2. Сравнение протеолитической активности фракций BLIS и коммерческой протеазы – субтилизина. Споты образцов препаратов в объеме 10 мкл наносили на чашку Петри с агаром, содержащим 1% казеина, и после суточной инкубации при 30 °С определяли диаметры зон гидролиза; для субтилизина размер зоны гидролиза принимали за 100%. Sub – субтилизин (1 мг/мл); Sub+PMSF – субтилизин, обработанный ингибитором PMSF; Sub+80° – термообработанный при 80 °С Sub; BLIS-BL – образец BLIS из *B. lentus*; BLIS-BL+PMSF – то же, обработанный ингибитором PMSF; BLIS+BL+80° – то же, термообработанный при 80 °С; BLIS-EM – образец BLIS из *E. mundtii*

Характеристика фракций BLIS, выделенных из *E. mundtii* и *B. lentus*

Фракции BLIS из	Устойчивость		Спектры активности*	Продукция секретир-уемой протеазы	Действие химотрипсина (10 мг/мл)
	в зоне pH	при нагреве			
<i>E. mundtii</i>	2–10	до 100 °С	Гр(+)	нет	разрушающее
<i>B. lentus</i>	2–10	до 100 °С	Гр(-)	есть	не действует

(*) против Гр(+) *Listeria monocytogenes*, Гр(-) *E. coli*, *Salmonella Enteritidis*

Из представленных на рис. 3 данных, видно, что BLIS *E. mundtii* дает четкую зону ингибирования (проба 1) *L. monocytogenes*, чего не наблюдается у BLIS *B. lentus* (проба 2); после смешивание образцов BLIS-EM и BLIS-BL из-за протеазы бацилл происходит полная потеря антилистериозной активности (проба 3); активность бактериоцина против *Listeria* остается, если к BLIS-EM добавляли прогретый (80 °С) BLIS-BL (проба 4) или проводили обработку PMSF (проба 5).

Известно, что устойчивость у бактерий к бактериоцинам, в отличие от антибиотиков, практически не развивается [5–7]. Однако еще в 1967 г. был установлен факт и природа резистентности некоторых видов *Bacillus* к низину – первому из недавно открытых бактериоцинов. Было определено, что устойчивость была обусловлена ферментом, названным «низиназой». При этом сам фермент не влиял на антибиотики пептидной природы – полимиксин, грамицидин или бацитрацин, но инактивировал лишь лантионин-содержащие бактериоцины – низин и субтилин.

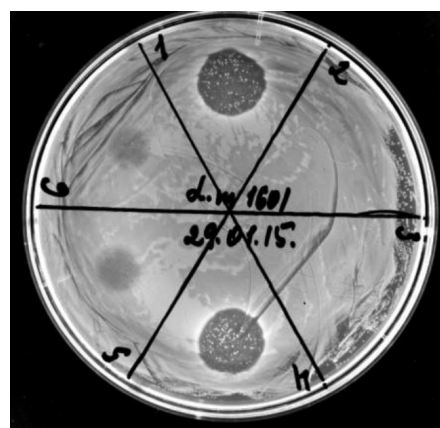


Рис. 3. Бактерицидная активность фракций BLIS-EM и BLIS-BL против *Listeria monocytogenes*. 1 – BLIS из *E. mundtii*; 2 – BLIS из *B. lentus*; 3 – BLIS-EM+BLIS-BL (1:1); 4 – BLIS-EM+BLIS-BL после прогрева при 80 °С; 5 – BLIS-EM+BLIS-BL после обработки PMSF; 6 – PMSF. Объемы проб BLIS – по 10 мкл

Таким образом, причиной инактивации бактериоцина *E. mundtii* В-7424 в составе

композиции является секретлируемая протеаза *B. lentus* B-7150, которая может быть инактивирована нагреванием (80 °C) или добавлением PMSF.

Заключение

В работе показано свойство штамма *B. lentus* B-7150 вырабатывать сериновую протеазу, способную инактивировать бактериоцин штамма *E. mundtii* B-7424. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, объясняющими причину устойчивости некоторых видов бактерий к антимикробным веществам. Кроме литического действия на низкомолекулярный пептид, из которого, собственно, и состоит бактериоцин *E. mundtii*, показаны и основные свойства сериновой протеазы *B. lentus* – ее разрушаемость при нагревании (80 °C), а также от воздействия специфического ингибитора – PMSF.

Полученные данные дают основание предполагать, что секретлируемые протеазы бацилл могут выступать в роли факторов регулирования активности антимикробных пептидов в микробиоме.

Список литературы

1. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клинический микробиологический журнал. 2010. Т. 12. № 4. С. 347–352.
2. Sudhakar Reddy R., Swapna L.A., Ramesh T., Rajesh Singh T., Vijayalaxmi N., Lavanya R. Bacteria in Oral Health – Probiotics and Prebiotics A Review. Int. J. Biol. Med. Res. 2011. № 2 (4). P. 1226–1233. DOI: 10.12691/jfs-5-2-1.
3. Храмов В.М., Калмангаев Т.А., Садикова Г.Т., Перельгин В.В., Похиленко В.Д. Антимикробный комплекс пептидной природы *Enterococcus mundtii* PPHS-5/13 // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2015. № 1 (29). С. 37–55.
4. Похиленко В.Д., Перельгин В.В., Садикова Г.Т., Чукина И.А., Лунева Н.И., Мицевич И.П. Штамм *Bacillus lentus* – продуцент бактериоциноподобной субстанции антимикробного действия и способ получения бактериоциноподобной субстанции // Патент РФ № 2530552. Подача заявки: 2013-03-04. Публикация патента: 10.10.2014. Бюл. № 28.
5. Abriouel H., Franz C.M., Omar N.B., Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews. 2011. Vol. 35. P. 201–232.
6. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. (February). Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics. Nature Reviews. Microbiology. 2013. № 11 (2). P. 95–105. DOI: 10.1038/nrmicro2937. PMID 23268227.
7. Nawrocki K.L., Crispell E.K., McBride Sh.M. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. Antibiotics (Basel). 2014. № 3 (4). P. 461–492. DOI: 10.3390/antibiotics3040461.