

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 579.6.632.937.15

Изучение штамма *Bacillus pumilus* В-13176, метаболиты которого обладают фунгицидной и антибактериальной активностью в отношении *Aspergillus niger* и *Staphylococcus aureus* (MRSA)

© 2018 А.И. КУЗИН^{1,*}, А.А. ТАГАЕВ², Т.В. ОВЧИННИКОВА^{2,3}, Н.И. КУЗНЕЦОВА¹, М.А. НИКОЛАЕНКО¹, О.А. МОРОЗОВА³, Р.Р. АЗИЗБЕКЯН^{1,**}

¹ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), Москва, 117545

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

*e-mail: aik53@rambler.ru

**e-mail: raziz@genetika.ru

Поступила 03.04.2018 г.

Принята в печать 22.05.2018 г.

В результате скрининга спорообразующих бактерий отобран штамм В-13176, обладающий антибактериальной и фунгицидной активностью, который по результатам анализа последовательностей переменных участков 16S РНК идентифицирован как *Bacillus pumilus*. Изучены культурально-морфологические свойства штамма, определена динамика синтеза фунгицидных и антибактериальных метаболитов и их локализация в культуре, а также устойчивость к физико-химическим факторам. Показано, что штамм обладает выраженной активностью против *Aspergillus niger* и метициллин-резистентного штамма *Staphylococcus aureus* (MRSA). Методами центрифугирования, ультрафильтрации, экстракции и ВЭЖХ проведено фракционирование культуральной жидкости. С помощью масс-спектрометрии показано, что штамм *Bacillus pumilus* В-13176 продуцирует биологически активные термостабильные и устойчивые к протеазам метаболиты пептидной природы, которые локализуются в осадке КЖ (фунгицидный компонент) или в надосадочной жидкости (антибактериальный компонент).

Ключевые слова: спорообразующие бактерии, *Bacillus pumilus*, MRSA, продуценты антибиотиков, пептиды.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-23-32

Инфекционные заболевания продолжают оставаться одной из серьезных проблем здравоохранения, поскольку бесконтрольная и не всегда целесообразная терапия антибиотиками приводит к развитию множественной лекарственной резистентности бактерий к известным антими-

кробным препаратам. В настоящее время в больницах по всему миру бактериальные патогены, обладающие множественной устойчивостью к антибиотикам, становятся обычным явлением, осложняя лечение и увеличивая тяжесть болезней и смертность [1–4].

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; КБ – картофельный бульон; КСА – картофельно-сахарозный агар; КЖ – культуральная жидкость; КОЕ – колониеобразующая единица; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) – золотистый стафилококк, устойчивый к метициллину.

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) известен как один из наиболее значимых возбудителей инфекционных заболеваний человека. Этот патоген может вызывать широкий спектр заболеваний, начиная от легких кожных инфекций (угри, фурункулы, флегмоны, карбункулы) до смертельно опасных заболеваний (пневмония, менингит, остеомиелит, эндокардит, инфекционно-токсический шок и сепсис). Некоторые штаммы *S. aureus* приобрели устойчивость к широкому кругу антибиотиков, в частности к пенициллинам (метициллин, диклоксациллин, нафциллин, оксациллин) и цефалоспорином. Часто встречаются метициллин-резистентные золотистые стафилококки [5].

В настоящее время MRSA является одним из важнейших возбудителей нозокомиальных инфекций во всем мире. Широкое распространение этих бактерий приводит к высокой летальности и дорогостоящему лечению. Программа исследования резистентности SENTRY позволила установить, что распространенность MRSA в США в 2000–2008 г. составила 57,3% от общего числа выделенных штаммов *Staphylococcus aureus*, а в Российской Федерации в 2006–2008 г. соответствующий показатель был равен 54,4% [6].

В последние десятилетия отмечается рост заболеваний, вызванных различными микроскопическими грибами. Грибковые инфекции представляют угрозу жизни пациентов, страдающих от злокачественных новообразований, гематологических заболеваний или хронических болезней внутренних органов [7]. Микроорганизмы р. *Aspergillus*, принадлежащие к мицелиальным микроскопическим грибам, широко распространены в окружающей среде и известны как возбудители оппортунистических микозов [8, 9]. Несмотря на использование новых методов диагностики и достижений в области терапии, а также наличие множества ранее открытых и новых антифунгальных препаратов, эффективность лечения таких инфекций довольно низка и, как следствие, смертность от инвазивных грибковых заболеваний остается весьма значительной [10].

Некоторые клинические штаммы *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, выделенные от больных людей, обладают высокой устойчивостью к ряду антимикотиков [11]. В работе [12] был определен видовой состав грибов р. *Aspergillus*, обнаруживаемых в полостных образованиях легких у больных туберкулезом и проведен анализ резистентности штаммов к широко распространенным противогрибковым препаратам.

Показано, что грибы данного рода были обнаружены в легочной полости у 49 пациентов из 458 больных туберкулезом; среди них вид *A. fumigatus* был детектирован у 29 больных, *A. terreus* – 6, *A. niger* – 5, а *A. flavus* – у 4 пациентов. При этом вид *A. terreus* обладал устойчивостью к амфотерицину В. Установлено также, что значения МИК для амфотерицина В в отношении разных видов возбудителей аспергиллеза были различными.

Кроме способности инфицировать людей, грибы р. *Aspergillus*, в частности, *A. niger*, являются возбудителями болезней сельскохозяйственных растений (кукурузы, пшеницы, цитрусовых). При этом не только снижается урожайность культур, но и происходит их загрязнение продуктами жизнедеятельности грибов – микотоксинами, которые накапливаются в сельскохозяйственных продуктах, ухудшают потребительские качества пищевого сырья, уменьшают его полноценность и безопасность для теплокровных организмов [13].

Проблему множественной лекарственной резистентности бактерий и грибов – возбудителей заболеваний – пытаются решить путем поиска новых антибиотиков, химической модификации известных веществ, а также синтеза новых лекарственных средств. В последние годы среди таких новых эффективных препаратов исследуют, в частности, так называемые “наноантибиотики” [14].

Бактерии *Bacillus* ssp. могут рассматриваться как один из объектов, имеющих наибольший потенциал в создании новых биологически активных соединений, обладающих фунгицидной и антибактериальной активностью. В качестве штаммов-продуцентов биологически активных соединений используются различные виды спорообразующих бацилл – *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. brevis* и др. При выборе штамма для индустриального процесса производитель исходит из ряда физиологических, биохимических и технологических свойств продуцента.

Целью данной работы было проведение скрининга среди 24 штаммов различных видов спорообразующих бактерий, обладающих антагонистической активностью, в первую очередь, в отношении *A. niger* и метициллин-резистентного штамма *S. aureus* (MRSA), а также в отношении фитопатогенных грибов. Предполагался отбор штамма с выраженной фунгицидной и антибактериальной активностью, который мог бы быть использован как при производстве биологических средств защиты растений, так и для создания

антимикотических и антибактериальных препаратов. Планировалось также изучение свойств данного штамма (определение спектра и локализации указанных видов активности, динамики их продукции, природы метаболитов-носителей активности и их молекулярной массы).

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты исследования

В работе использовали различные штаммы спорообразующих бактерий *Bacillus* ssp. и фитопатогенных грибов из коллекции лаборатории биологически активных соединений (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), выделенные из образцов, собранных в различных климатогеографических регионах. Штамм гриба *Fusarium sporotrichioides* MFG11039 получен из коллекции лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского института защиты растений (Санкт-Петербург, Пушкин). Штаммы грибов р. *Aspergillus* – *A. niger* F879, *A. nidulans* F1069, *A. flavus* F1271, *A. terreus* F1269 и *A. clavatus* F1274 – предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва). Штаммы бактерий из различных образцов клинического материала получены от межклинической бактериологической лаборатории (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова). Штамм *Micrococcus luteus* NCIM В 13267 (Fleming strain 2665) депонирован в коллекции лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха, Москва.

Среды и условия культивирования

Исследуемый штамм *B. pumilus* В-13176 высеивали на чашки Петри с агаризованной средой NB (HiMedia, Индия) следующего состава, г/л: пептон – 5,0, натрия хлорид – 5,0, мясной экстракт – 1,5, дрожжевой экстракт – 1,5, агар (Difco, США) – 17,0; дистиллированная вода – до 1 л; рН 7,4±0,2. Бациллы выращивали до появления отдельных колоний и отсутствие посторонней микрофлоры оценивали визуально и с помощью световой микроскопии. Для приготовления посевного материала одну петлю исследуемого штамма стерильно вносили в стандартные микробиологические пробирки емкостью 50 мл³ с 5 мл жидкой питательной среды (гидролизные дрожжи (ЗАО Каннский биохимический завод) – 45,0 г; вода до 1л; рН 7,2–7,4) и культивировали на качалке при 260 об/мин и температуре 30 °С в течение 14–16 ч. Затем содержимое пробирки сте-

рильно вносили в стандартные стеклянные конические колбы Эрленмейера емкостью 750 см³ с 50 мл жидкой стерильной питательной среды на основе гидролизных дрожжей и культивировали в течение 72 ч на качалке (260 об/мин) при температуре 30 °С. Затем методом световой микроскопии устанавливали отсутствие посторонней микрофлоры в КЖ и определяли уровень спорообразования бацилл.

Культивирование тест-грибов проводили на картофельно-сахарозном агаре. КСА готовили путем варки 200 г очищенного нарезанного ломтиками картофеля в 1 л кипящей водопроводной воды в течение 3–5 мин. Приготовленный отвар фильтровали через марлю, помещали в мерную посуду, добавляли сахарозу («Химмед», Россия) до 20,0 г/л и агар до 20,0 г/л и доводили объем смеси до 1 л при рН 7,0–7,2.

Для культивирования тест-бактерий использовали бульон Мюллера-Хинтона и агар Мюллера-Хинтона (HiMedia). Бульон имел следующий состав, г/л: вытяжка из говядины – 300,0, кислотный гидролизат казеина – 17,5, растворимый крахмал – 1,5; дистиллированную воду добавляли до объема 1 л; рН 7,4±0,2. Агар Мюллера-Хинтона состоял из одноименной среды с добавлением агара (17,0 г/л), рН 7,3±0,2.

Определения фунгицидной активности штамма В-13176 методом лунок с помощью тест-грибов р. *Aspergillus*

Для этой цели использовали описанную ранее процедуру [15]. Тест-культуры грибов р. *Aspergillus* культивировали на чашках Петри с КСА в течение 3–5 сут при 30 °С до образования спороносных структур с конидиями. Инокулюм готовили путем переноса петель спор (конидий) в пробирку с 5 мл стерильной дистиллированной воды. Определяли титр спор и для дальнейшей работы использовали водную суспензию с титром 10⁶–10⁷ спор/мл, которую хранили при 4 °С. Далее 100 мкл суспензии вносили в чашки Петри с 20 мл КСА и растирали шпателем по всей поверхности чашки. В вырезанные в агаре металлическим пробойником лунки диаметром 8 мм вносили по 150 мкл фракций КЖ тестируемого штамма бацилл. Контрольными служили лунки, в которые вносили эквивалентный объем среды для культивирования исследуемого штамма или стерильную дистиллированную воду. Чашки инкубировали 48–72 ч в термостате при 30 °С. Эффективность фунгицидного действия определяли по диаметру зоны торможения роста гриба вокруг лунки (мм).

Определение антибактериальной активности штамма В-13176 методом лунок с помощью тест-бактерий

Для определения антибактериальной активности штамма суспензию тест-бактерий готовили, как описано в [16]. Тест-бактерии вносили в чашки Петри с 20 мл агара Мюллера-Хинтона и растирали шпателем по всей поверхности чашки. В вырезанные в агаре металлическим пробойником лунки диаметром 8 мм вносили по 150 мкл фракций КЖ штамма. В качестве контрольных использовали лунки с питательной средой или стерильной дистиллированной водой. Чашки инкубировали 24 ч в термостате при 37 °С. Эффективность антибактериального действия штамма определяли по диаметру зоны торможения роста тест-культуры вокруг лунки (мм).

Определение динамики продукции фунгицидных и антибактериальных метаболитов

Указанный процесс оценивали путем отбора проб КЖ через различные промежутки времени в ходе культивирования штамма и определения в них фунгицидной и антибактериальной активности фракций КЖ – осадка и надосадочной жидкости – методом лунок (см. выше).

Локализация фунгицидных и антибактериальных метаболитов

Для определения локализации метаболитов бацилл КЖ штамма осаждали центрифугированием при 4100 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали и пропускали через фильтр Millipore, HA, 0,2 мкм (Millipore, Франция) для удаления клеток и спор. Осадок трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Анализ устойчивости метаболитов к воздействию температуры и протеолитических ферментов

Термостабильность антибактериальных метаболитов определяли путем прогревания надосадочной жидкости исследуемого штамма бацилл (см. выше) в термостате TERMO 24-15 (Biokom, Россия) при 80 °С в течение 15 мин. Для определения чувствительности антибактериальных метаболитов к протеолитическим ферментам к супернатанту КЖ добавляли трипсин (1 мг/мл), проназу Е (1 мг/мл) или протеиназу К (500 мкг/мл) (все препараты фирмы Sigma, США) и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С.

Идентификацию штамма В-13176 с помощью анализа 16S рРНК проводили, как описано ранее [17].

Определение минимальной ингибирующей концентрации КЖ, осадка и надосадочной жидкости исследуемых штаммов бацилл

Указанные фракции КЖ исследуемого штамма после культивирования в жидкой среде анализировали под микроскопом на наличие посторонней микрофлоры. Затем готовили двукратные разведения фракций в стерильной дистиллированной воде и определяли МИК в каждой фракции методом лунок (см. выше) как наименьшую концентрацию фунгицидных и антибактериальных метаболитов, подавляющую рост тестируемого микроорганизма *in vitro* и присутствующую в последнем разведении, в котором выявлялась антибиотическая активность.

Фракционирование культуральной жидкости для изучения носителей фунгицидной и антибактериальной активности с помощью масс-спектрометрии

Надосадочную жидкость упаривали и подвергали двукратной экстракции (по 50 мл) н-бутанолом (чда, ЗАО «ЭКОС-1», Россия). Водную фазу удаляли с помощью делительной воронки. Полученный бутанольный экстракт упаривали на роторно-вакуумном испарителе (Heidolph, США) с избытком воды до полного удаления н-бутанола и остаточного объема воды 40–50 мл. К водному раствору добавляли ацетатно-аммонийный буфер (Merck), рН 5,6, до конечной концентрации 30 мМ, после чего добавляли ацетонитрил (осч, «Химмед», Россия) до конечной концентрации 30% (об.). Исследуемый раствор наносили при скорости потока 2 мл/мин на колонку (2,5×10 см) носителя Диасорб-100-С8Т (63–200 мкм, «Био-ХимМак СТ», Россия), уравновешенную 30 мМ ацетатно-аммонийным буфером, рН 5,6, в 30%-ном ацетонитриле. Затем колонку промывали 100 мл того же буфера. Связавшиеся с носителем вещества элюировали 50 мл 30 мМ ацетатно-аммонийного буфера, рН 5,6, в 80%-ном ацетонитриле. Элюат концентрировали на роторном испарителе до объема 5–6 мл и добавляли метанол (осч, «Реахим», Россия) до концентрации 30% (об.). Осадок экстрагировали этанолом (10 мл на 1 г осадка) в течение 24 ч при 5 °С и перемешивании. Экстракт подвергали 4-кратной концентрации и спиртовые концентраты разделяли с помощью ВЭЖХ на колонке Luna 5μ С8(2) (100Å,

250×4,6 мм, Phenomenex, США) при скорости потока 0,5 мл/мин. Разделение проводили на хроматографе ВЭЖХ (Beckman, США) в линейном градиенте от 0 до 100% буфера Б в буфере А в течение 40 мин (буфер А: метанол – 60%, ацетонитрил – 5%; буфер Б: метанол – 75%, ацетонитрил – 22,5%). На колонку наносили по 500 мкл раствора; смывы с колонки анализировали при длине волны 214 нм.

Масс-спектрометрия

Масс-спектры фракций КЖ – осадка и надосадочной жидкости – были получены с помощью времяпролетного масс-спектрометра MALDI (Reflex III BRUKER, Германия), оснащенного УФ-лазером, при длине волны 337 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор штаммов, обладающих фунгицидной и антибактериальной активностью

Известно, что спорообразующие бактерии р. *Bacillus* являются антагонистами различных микроорганизмов – грибов, бактерий, микроводорослей. Ингибирующее действие бацилл может реализоваться за счет образования комплекса ферментов, осуществляющих лизис клеточных стенок микроорганизмов, а также синтеза антибиотических веществ различной природы [18].

В результате скрининга спорообразующих бактерий был отобран штамм B-13176 с выраженной фунгицидной и антибактериальной активностью в отношении *A. niger* и *S. aureus* (MRSA),

который по результатам анализа последовательностей переменных участков гена 16S РНК идентифицирован как *B. pumilus*.

Культурально-морфологические характеристики штамма *B. pumilus* B-13176

Через 72 ч культивирования титр штамма составлял $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. Штамм через 24 ч инкубации в термостате при 30 °С на агаризованной среде NB образовывал блестящие выпуклые колонии серовато-белого цвета с ровными краями диаметром 2–3 мм. Методом световой микроскопии показано, что клетки штамма имеют форму прямых палочек с закругленными краями размером $(0,6–0,7) \times (1,0–3,1)$ мкм и цепочек не образуют. Центральные расположенные эллипсоидные споры имеют размеры $(0,7–0,8) \times (1,0–1,7)$ мкм.

Определение спектра и локализации фунгицидной и антибактериальной активности штамма *B. pumilus* B-13176

Известно, что большинство антагонистических факторов спорообразующих бактерий секретируются из клеток в процессе роста культуры. Мы определили фунгицидное и антибактериальное действие различных фракций культуры штамма B-13176: интактной КЖ, осадка и надосадочной жидкости. Полученные данные представлены в табл. 1, 2 и на рис. 1. Показано, что фунгицидная активность штамма локализована в КЖ и осадке, тогда как надосадочная жидкость фунгицидной активностью не обладает. Антибактериальная активность штамма, наоборот, связана

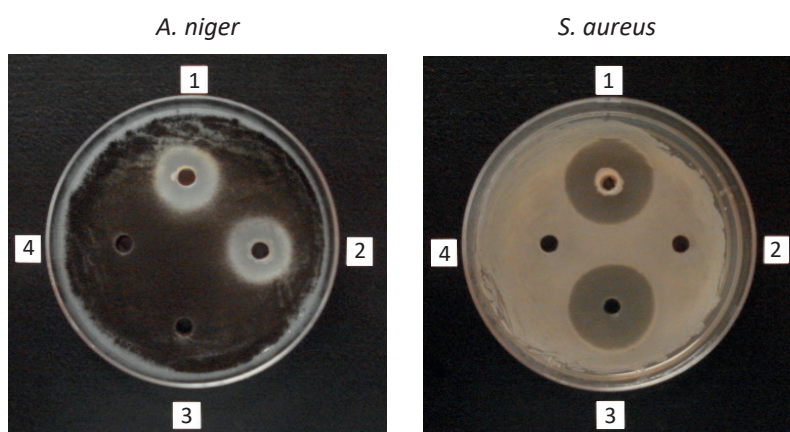


Рис.1. Антагонистическая активность различных фракций КЖ штамма *B. pumilus* B-13176: слева – фунгицидная (тест-объект *A. niger*), справа – антибактериальная (*S. aureus*). 1 – КЖ; 2 – осадок; 3 – надосадочная жидкость; 4 – контроль (питательная среда)

Fig. 1. Antagonistic activities of *B. pumilus* B-13176 strain CL fractions: (1), CL; (2), pellet; (3), supernatant; and (4), control (nutrient medium). On the left, fungicide activity (*A. niger* as test subject) and on the right, antibacterial activity (*S. aureus* as test subject).

Спектр и локализация фунгицидной активности штамма *B. pumilus* B-13176Spectrum and location of fungicide activity of *B. pumilus* B-13176 strain

Тест-грибы	Фракции культуральной жидкости		
	КЖ	Осадок	Надосадочная жидкость
<i>Fusarium solani</i>	+	+	–
<i>F. oxysporum</i>	+	+	–
<i>F. nivale</i>	+	+	–
<i>F. sporotrichioides</i>	+	+	–
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	+	–
<i>Phoma solanicola</i>	+	+	–
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	–
<i>Alternaria tenuis</i>	+	+	–
<i>Cercospora zeaе-maydis</i>	–	–	–
<i>Bothrytis cinerea</i>	+	+	–
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	–
<i>A. nidulans</i>	–	–	–
<i>A. flavus</i>	–	–	–
<i>A. terreus</i>	–	–	–
<i>A. clavatus</i>	–	–	–

Примечание: Здесь и в табл. 2 (+) и (–) – чувствительность и устойчивость, соответственно, тест-микроорганизмов к действию фракции КЖ бацилл.

Footnote: Here and in Table 2, (+) and (–) mean sensitivity or resistance, respectively, of test microorganisms to bacilli culture broth fraction.

Спектр и локализация антибактериальной активности штамма *B. pumilus* B-13176Spectrum and location of antibacterial activity of *B. pumilus* B-13176 strain

Тест-бактерии	Фракции культуральной жидкости		
	КЖ	Осадок	Надосадочная жидкость
<i>Proteus mirabilis</i> 239*	–	–	–
<i>Acinetobacter baumannii</i> 213*	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> 238*	–	–	–
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 107*	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 236*	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) 600*	+	–	+
<i>Salmonella enteritidis</i> *	–	–	–
<i>Micrococcus luteus</i> NCIMB 13267	+	–	+
<i>Bacillus cereus</i> 560	–	–	–
<i>B. amyloliquefaciens</i> 1888	–	–	–
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> 69-6	+	–	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i> 98	+	–	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> 1-T	+	–	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> 79-31	+	–	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1-5	+	–	+

*Штамм из клинического материала (strain from clinical material).

с надосадочной жидкостью, т.е. соответствующие антибактериальные метаболиты являются секретуемыми. Показано, что они подавляют развитие *S. aureus* (MRSA), *M. luteus* и ряда штаммов *B. thuringiensis* различных серотипов (см. табл. 2).

Определение динамики продукции фунгицидных и антибактериальных метаболитов штамма *B. pumilus* В-13176

В работах [19, 20] показано, что фунгицидные и антибактериальные метаболиты бактерий р. *Bacillus* обнаруживаются в КЖ уже через 12 ч после начала роста культуры и их содержание возрастает, достигая максимума на стадии спорообразования штамма.

Для определения динамики синтеза антагонистических метаболитов в процессе культивирования штамма *B. pumilus* В-13176 пробы КЖ отбирали через различные промежутки времени и методом лунок оценивали активность фракций культуральной жидкости на тест- культурах (табл. 3).

Как следует из табл. 3, максимальную фунгицидную активность осадка против *A. niger* наблюдали через 72 ч культивирования, а максимальную антибактериальную активность надосадочной жидкости в отношении *S. aureus* и *M. luteus* – через 48 ч культивирования.

МИК осадка КЖ для *A. niger* регистрировали при разведении 1:512, а МИК надосадочной жидкости для *S. aureus* и *M. luteus* – при разведении 1:64.

Характеристика термостабильности фунгицидных и антибактериальных метаболитов штамма *B. pumilus* В-13176 и их устойчивости к действию протеолитических ферментов

Физико-химические характеристики (термостабильность, чувствительность к протеолитическим ферментам) фунгицидных и антибак-

териальных метаболитов в значительной степени определяют возможность их практического использования.

Большинство указанных метаболитов, секретуемых в окружающую среду, устойчивы к действию повышенной температуры и различных протеолитических ферментов [21]. Нами показано, что секретуемые штаммом *B. pumilus* В-13176 фунгицидные и антибактериальные метаболиты не являются исключением: они устойчивы к действию протеолитических ферментов (трипсина, проназы Е и протеиназы К) и к прогреванию в течение 15 мин при температуре 80 °С (данные не приведены).

ВЭЖХ спиртовых экстрактов и масс-спектрометрия полученных фракций

Спиртовые экстракты осадка и надосадочной жидкости штамма *B. pumilus* В-13176 разделяли с помощью ВЭЖХ (см. «Условия эксперимента») и полученные фракции анализировали методом масс-спектрометрии. Фракции осадка, тестировали на фунгицидную активность в отношении *A. niger*, а фракции надосадочной жидкости – на антибактериальную активность против *S. aureus*. Из образцов осадка наибольшей фунгицидной активностью обладала фракция 1.3 с *m/z* 1086,875 (рис. 2), а ее МИК соответствовала разведению 1:8 и составляла 125 мкг/мл.

Фракция 4 с *m/z* 1058,554 (рис. 3), полученная из супернатанта, обладала высокой антибактериальной активностью в отношении *S. aureus*. МИК содержалась в разведении 1:16 и составляла 62,5 мкг/мл.

Метаболиты с близкими значениями молекулярной массы, обладающие фунгицидной и антибактериальной активностью, описаны в работах [22, 23] и идентифицированы как липопептиды семейства итуринов.

Таблица 3

Зависимость антагонистической активности фракций культуральной жидкости штамма *B. pumilus* В-13176 от времени культивирования

Antagonistic activity of CL fractions of B. pumilus В-13176 strain depending on time of culturing

Тест-культура	Диаметр зоны торможения роста тест-культуры вокруг лунки (мм)					
	Осадок			Надосадочная жидкость		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
<i>A. niger</i>	14,7±0,18	17,7±0,09	23,3±0,09	–	–	–
<i>S. aureus</i>	–	–	–	24,7±0,09	28,7±0,23	26,7±0,23
<i>M. luteus</i>	–	–	–	21,7±0,09	26,7±0,23	24,7±0,32

Примечание: (–) – отсутствие зоны торможения роста (no growth inhibition zone).

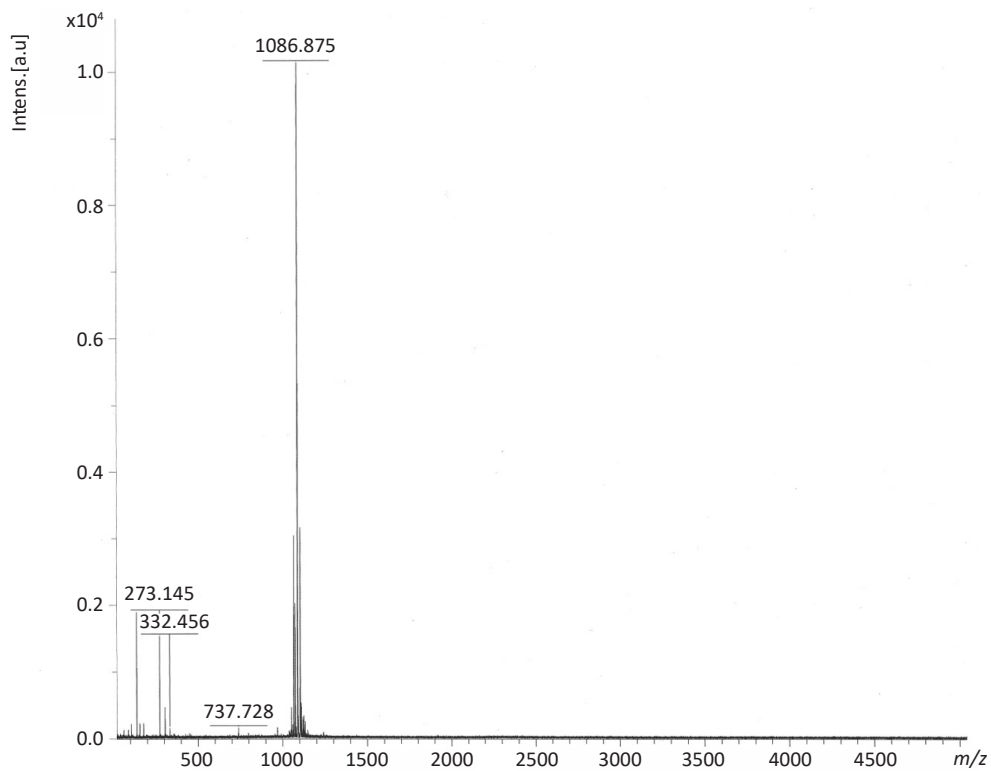


Рис. 2. Масс-спектр фракции 1.3 из осадка культуральной жидкости штамма *B. pumilus* B-13176

Fig. 2. Mass-spectrum of fraction 1.3 obtained from pellet of *B. pumilus* B-13176 strain CL

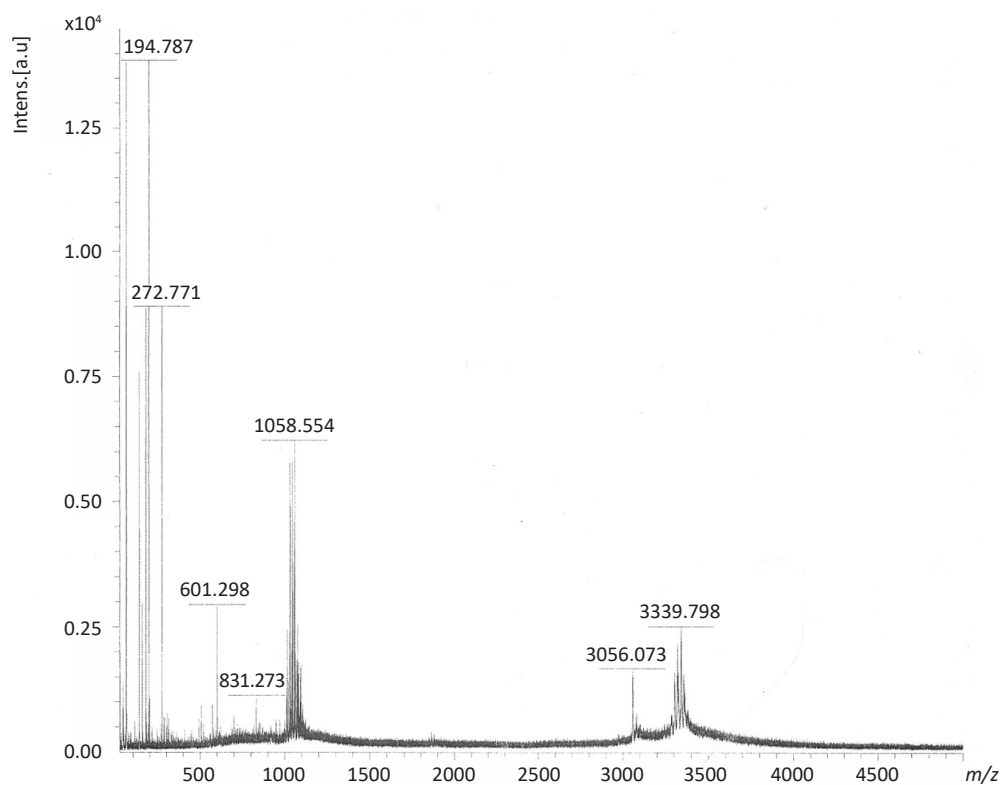


Рис. 3. Масс-спектр фракции 4 из надосадочной жидкости штамма *B. pumilus* B-13176

Fig. 3. Mass-spectrum of fraction 4 obtained from supernatant of *B. pumilus* B-13176 strain CL

Кроме того, во фракции 4 (см. рис. 3), полученной из надосадочной жидкости, определен двухкомпонентный пептидный комплекс с m/z 3056,073 и 3339,798. Подобные двухкомпонентные пептидные антибиотики, обладающие выраженной антибактериальной активностью, описаны и у других бактерий, например, лантибиотики из культуры *B. licheniformis* VK21 [24].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что выделенный нами штамм *B. pumilus* В-13176 обладает выраженной фунгицидной активностью в отношении *A. niger* и антибактериальной активностью в отношении *S. aureus* (MRSA) и может быть использован для создания на его основе антимикотических и антибактериальных препаратов.

Исследования по выделению и характеристике антимикробных метаболитов пептидной природы выполнены за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131)

ЛИТЕРАТУРА

- Cohen M.L. Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 2000, 406, 762–767.
- Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 2000, 406, 775–781.
- Tenover F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Amer. J. Med.*, 2006, 119, 3–10.
- Дебабов Д.В. Устойчивость к антибиотикам: происхождение, механизмы, подходы к преодолению. *Биотехнология*, 2012, (4), 7–17.
- Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, 10(3), 505–520.
- Романов А.В., Дехнич А.В. Типирование MRSA: какие методы являются оптимальными для решения различных задач? *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2011, 13(2), 168–176.
- Richards M.J., Edward J.R., Culver D.H., and Gaynes R.P. Nosocomial Infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit. Care Med.*, 1999, 27, P. 887–892.
- Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med. Mycol.*, 2005, 43, Supp., 1, 59–65.
- Klich M.A. Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol. Ind. Health.*, 2009, 25, 657–667.
- Van Thiel D.H., George M., Moore C.M. Fungal Infections: Their Diagnosis and Treatment in transplant recipients. *Int. J. Hepatol.*, 2012, 12, 1–19.
- Van der Linden J.W.M, Warris A, Verweij P.E. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med. Mycol.*, 2011, 49, Supp., 1, 82–89.
- Кулько А.Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. М.: Изд-во МНПЦБТ, 2012, 9–151.
- Монастырский О.А. Опасные грибы. Сельскохозяйственные аспекты исследований фитопатогенных токсинобразующих грибов. *Агро XXI*, 1998, 10, 18–19.
- Huh Ae Jung, Kwon Young Jik “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release*, 2011, 156, 128 – 145.
- Кузин А.И., Кузнецова Н.И., Николаенко М.А., Азизбеян Р.Р. Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* 16-K11, обладающий фунгицидной активностью против возбудителей фузариоза зерновых культур. *Биотехнология*, 2013, (5), 31–39.
- Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2001, 3(4), 348–354.
- Кузин А.И., Кузнецова Н.И., Григорьева Т.М., и др. Штамм *Bacillus thuringiensis* Т-281, обладающий биарной пестицидной активностью. *Биотехнология*, 2008, (4), 28–34.
- Азизбеян Р.Р. Использование спорообразующих бактерий в качестве биологических средств защиты растений. *Биотехнология*, 2013, (1), 69–77.
- Усманов В.И., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., и др. Особенности биосинтеза антимикотических соединений штаммом *Bacillus subtilis* ИБ-54 – антагонистом грибов-дерматофитов. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*, 2010, 1, 231
- Awais M., Pervez A., Qayyum S., Saleem M. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. *African J. Microbiology Res.*, 2008, 2, 114–119.
- Nair J.R., Singh G., Sekar V. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, 93, 772–780.
- Brack C., Micolasch A., Schlueter R., et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Mar. Biotechnol. NY*, 2015, 17(3), 290–304.
- Zhao X., Zhou Z.J., Han Y., et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey. *Microbiol. Res.*, 2013, 168(9), 598–606.
- Shenkarev Z.O., Finkina E.I., Nurmukhamedova E.K., et al. Isolation, structure elucidation, and synergistic antibacterial activity of a novel two-component lantibiotic lichenicidin from *Bacillus licheniformis* VK21. *Biochemistry*, 2010, 49, 6462–6472

Characteristics of *Bacillus pumilus* B-13176 strain Producing Metabolites with Fungicide and Antibacterial Activities to *Aspergillus niger* and *Staphylococcus aureus* (MRSA)

© 2018 A.I. KUZIN^{1,*}, A.A. TAGAEV², T.V. OVCHINNIKOVA^{2,3}, N.I. KUZNETSOVA¹, M.A. NIKOLAENKO¹, O.A. MOROZOVA³, and R.R. AZIZBEKYAN^{1,**}

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute” (NRC “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

²Shemyakin-and-Ovchinnikov Institute for Bioorganic Chemistry, Russ. Acad. Sci., 117997, Moscow Russia

³Sechenov First State Medical University, 119991, Moscow Russia

*e-mail: aik53@rambler.ru

**e-mail: raziz@genetika.ru

Received April 3, 2018

Accepted May 22, 2018

Abstract—A strain B-13176 that manifested the antibacterial and fungicidal activities has been isolated by screening of sporiferous bacteria and identified as *Bacillus pumilus* on the basis of the analysis of variable regions of 16S RNA sequences. Cultural and morphological characteristics of the strain were studied, the dynamics of the synthesis of fungicidal and antibacterial metabolites and their location in culture were determined, and their resistance to physicochemical factors was investigated. It was shown that the strain possesses a pronounced activity against the fungi of *Aspergillus niger* and the methycillin-resistant bacteria of *Staphylococcus aureus* strain (MRSA). The culture liquid of the strain was fractioned using centrifugation, ultrafiltration, extraction and HPLC. Mass-spectrometry was used to show that the *Bacillus pumilus* B-13176 strain produces active thermostable protease-resistant metabolites of the peptide origin that are located in the CL pellet (the fungicidal component) and in the CL supernatant (the antibacterial component).

Key words: sporiferous bacteria, *Bacillus pumilus*, MRSA, producers of antibiotics, peptides.

Acknowledgements—The investigation on the isolation and characterization of the antimicrobial metabolites of the peptide origin were performed at the expense of the grant from the Russian Science Foundation (Project no. 14-50-00131).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-3-23-32