

# Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры

В.Д.Похиленко, Т.А.Калмантаев, И.А.Дунайцев, К.В.Детушев, А.А.Кисличкина, Т.Н.Мухина, И.А.Чукина

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В цели данного исследования входило обнаружение, отработка способа выделения и оценка свойств бактериоцина сапрофитной спорообразующей бактерии *Bacillus subtilis*, изолированной из растения пассифлоры. Обнаружено, что в условиях анаэробно-и глубинного культивирования синтез штамм *B. subtilis* продуцирует два низкомолекулярных пептида – 3,4 и 5,9 кДа, накапливаемых в ферментате. С помощью методов электрофореза проб и последующего биотестирования полиакриламидной гелевой пластины показано, что антимикробной активностью обладает лишь пептид с молекулярной массой 3,4 кДа. Был отработан способ выделения активного вещества из смеси пептидов и определена его удельная активность. Молекулярная масса активного пептида, подтвержденная методом масс-спектропии (MALDI TOF-MS), соответствует субтилозину А – одному из 9 бактериоцинов, описанному у *B. subtilis*. Пептид переносит кипячение, перепады pH в широком диапазоне (2–10 ед.), но разрушается протеолитическими ферментами, что свойственно лантибиотикам – группе бактериоцинов класса I. Выделенный пептид (3,4 кДа) активен в отношении таких групп патогенных бактерий, как *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, что делает его привлекательным для использования в качестве доступного антимикробия природного происхождения

**Ключевые слова:** пептид, бактериоцин, *Bacillus subtilis*, выделение, свойства, антимикробная активность

**Для цитирования:** Похиленко В.Д., Калмантаев Т.А., Дунайцев И.А., Детушев К.В., Кисличкина А.А., Мухина Т.Н., Чукина И.А. Выделение и характеристика бактериоцина штамма *Bacillus subtilis*, изолированного из пассифлоры. Бактериология. 2022; 7(1): 9–17. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17

## Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora

V.D.Pokhilenko, T.A.Kalmantaev, I.A.Dunaytsev, K.V.Detushev, A.A.Kislichkina, T.N.Mukhina, I.A.Chukina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The purpose of this study was to detect, develop a method for isolating and evaluating the properties of bacteriocin of a saprophytic spore-forming bacterium *Bacillus subtilis* isolated from a passionflower plant.

It was found that under the conditions of anaerobiosis and submerged synthesis, the *B. subtilis* strain produces two low molecular weight peptides, 3.4 and 5.9 kDa, accumulated in the fermentate. By the methods of sample electrophoresis and subsequent biotesting of a polyacrylamide gel plate, it was shown, that only a peptide with a molecular weight of 3.4 kDa has antimicrobial activity. A method for isolating the active substance from a mixture of peptides has been developed and its specific activity was determined. The molecular weight of the active peptide, confirmed by mass spectroscopy (MALDI TOF-MS), corresponds to subtilisin A, one of the 9 bacteriocins described in *B. subtilis*. The peptide tolerates boiling, pH fluctuations in a wide range (2–10 units), but is destroyed by proteolytic enzymes, which is characteristic of lantibiotics, a group of class I bacteriocins.

The isolated 3.4 kDa peptide is active against such groups of pathogenic bacteria as *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*. The peptide is attractive for use as an available antimicrobial of natural origin.

**Key words:** peptide, bacteriocin, *Bacillus subtilis*, isolation, properties, antimicrobial activity

**For citation:** Pokhilenko V.D., Kalmantaev T.A., Dunaytsev I.A., Detushev K.V., Kislichkina A.A., Mukhina T.N., Chukina I.A. Isolation and characteristics of bacteriocin from *Bacillus subtilis* strain, isolated from passiflora. Bacteriology. 2022; 7(1): 9–17. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-9-17

### Для корреспонденции:

Похиленко Виктор Данилович, доктор технических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, территория «Квартал А», 24, ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

Статья поступила 18.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

### For correspondence:

Victor D. Pokhilenko, PhD, DSc (Technical Sciences), Leading Researcher of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0027

E-mail: pokhilenko@obolensk.org

The article was received 18.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

**B** *acillus subtilis* – широко распространенная и хорошо известная грамположительная спорообразующая бактерия, производящая более двух десятков антимикробных веществ (АМВ), большинство из которых имеют пептидную природу [1]. Существует два основных пути биосинтеза этим микроорганизмом такого рода пептидов: с помощью поликетидсинтеза без участия рибосом и на рибосомах [2]. Бактериоцины – группа синтезируемых на рибосомах пептидов, способных убивать генетически близкородственные штаммам-продуцентам микроорганизмы [3]. В связи с этим бактериоцины часто рассматриваются в качестве собственного «оружия» некоторых бактерий, помогающего конкурировать за пищу и защищать себя в природе. Бактериоцины молочнокислых бактерий, от которых, собственно, и возникла вся история этой группы природных антибиотиков, были впервые описаны еще несколько десятилетий тому назад, и к настоящему времени некоторые из них (низин, субтилин, эпидермин, галлидермин, пер-5, эрицин, субтилин, субтилозин) нашли широкое применение в пищевой и мясо-молочной промышленности [4]. В последние годы бактериоцины стали представлять интерес в качестве антимикробных соединений для применения в фармацевтической, сельскохозяйственной и биохимической промышленности [5], а также при лечении инфекций, вызываемых возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью [6, 7].

Следует особо подчеркнуть, что по сравнению с традиционными антибиотиками или пищевыми консервантами бактериоцины не токсичны для человеческого организма, поскольку наши клетки не имеют рецептора, распознаваемого бактериоцинами и благодаря которому они запускают механизм образования пор в мембране [8, 9]. Поскольку бактериоцины синтезируются на рибосомах и структурные гены могут быть легко изменены генетически, они интересны еще и своей возможностью служить отличными инструментами для геномной инженерии новых АМВ. В настоящее время считается, что более 99% бактерий могут продуцировать по крайней мере один тип бактериоцинов, однако большинство из них еще только предстоит изучить [10]. Бактериоцины на основании данных по молекулярной массе, термостабильности, чувствительности к ферментам, механизму действия принято подразделять на 4 класса [11]. Большинство бактериоцинов, продуцируемых видами *Bacillus*, относятся к первому (I) классу [12]. Бактериоцины этого класса из-за содержащегося в них лантионина (редкой тиоэфирной аминокислоты) принято называть лантибиотиками [13]. У представителей рода *Bacillus* выделены и описаны такие лантибиотики, как субтилин, субтилозин А, эрицин, мерсацидин, субтиломицин, субланцин, эпидермин [14, 15]. Технология их выделения базируется в основном на методах мембранной фильтрации, экстракции в системе органических растворителей и хроматографии [16]. Методы экстракции в органических растворителях дают возможность выделять вещество из значительного объема ферментата, но не лишены недостатков.

Следует заметить, что бактериоцины, образуемые *Bacillus* spp., демонстрируют более широкий антимикробный спектр, чем большинство бактериоцинов молочнокислых бактерий [17, 18]. Считается, что в биосинтезе различных антимикробных соединений участвует 4–5% генома *B. subtilis* [1]. У этого

вида бацилл найдено 6 бактериоцинов – субтилин, эрицин S, эрицин А, мерсацидин, субланцин 168 и субтилозин [18–21]. Если первые пять близки к низину молочнокислых бактерий, имеющему линейную структуру, то субтилозин представляет собой циклическую молекулу из 35 аминокислот, что наделяет его новыми свойствами.

Таким образом, виды из рода *Bacillus* представляют собой большой пул для скрининга и открытия новых бактериоцинов [22]. В этом исследовании мы получили и охарактеризовали противомикробный пептид от *B. subtilis* П19, штамма, выделенного нами из растительной массы пассифлоры. Этот новый бактериоцин, по характеристикам соответствующий субтилозину, может служить в качестве основы противомикробного средства или пищевым консервантом, и этим он представляет практический интерес.

## Материалы и методы

*Штамм, способ идентификации и условия выращивания.* Штамм был выделен из растительного сырья – страстоцвета (*Passiflora edulis*), на практике используемого для приготовления иммуномодуляторной пищевой добавки «Пассифлора» («Фарм-про», Россия). На основе изучения культурально-морфологических, биохимических признаков штамм был отнесен к виду *subtilis* из рода *Bacillus*. На основании MALDI-TOF Biotyper (Bruker) штамм определен с высокой долей вероятности (2,32–2,357) как *B. subtilis*. Видовая принадлежность штамма была также подтверждена методом генотипирования по 16S РНК. Штамм П19 *B. subtilis* в лиофилизированном виде хранится в государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск» под инв. № В-8711.

Субкультивирование штамма проводили на чашках Петри с питательным агаром (Nutrient Agar M001, HiMedia, Индия), ГРМ-агаром («Питательные среды», Оболенск, Россия) либо крахмальным агаром (Starch agar, Ref.1-283, Scharlau, EU) при 30°C и 36°C в течение суток. Выросшие посевы просматривали на биологическую однородность и в дальнейшую работу брали чашки с типовыми для штамма колониями. Из клеточной массы, собранной с поверхности агаризованной питательной среды (в основном ГРМ-агара), готовили взвеси клеток с применением бактериального стандарта мутности по Мак-Фарланду, равного 4 единицам (около  $1,2 \times 10^9$ /мл по КОЕ).

Клеточными суспензиями в количестве 1% (по объему) засеивали 750 мл колбы Эрленмейера со 100 мл питательной среды. Инкубацию посевов осуществляли на качалке (36°C, 130 об./мин). На этапе выбора питательных сред использовали как готовые коммерческие составы (например, ГРМ-бульон), так и экспериментальные варианты (табл. 1).

*Оценка показателей культуральной жидкости.* После остановки инкубации в пробах культуральной жидкости (КЖ) определяли кислотность (рН), концентрацию живых клеток, каталазную и антимикробную активность. При этом концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) оценивали культуральным методом с посевом разведений пробы на ГРМ-агар и последующим подсчетом выросших колоний. Антимикробную активность оценивали нанесением 10 мкл проб КЖ и бесклеточного супернатанта КЖ на поверхность свежесезянного газона с тест-штаммом микроба. Если по-

Таблица 1. Варианты прописей, используемых при выборе питательных сред

Компоненты	Наименование основы среды и концентрация компонентов*, г/л											
	ГРМ	АС	АТ	ФС	ГК	ДЭ	ДС	ГКД	М	Т	АХ	
ГРМ-бульон	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гидролизат казеина	–	–	–	–	10	–	–	10	–	–	–	–
Дрожжевой экстракт	5	5	5	5	–	5	5	5	–	–	–	–
Магния сульфат	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Аммония сульфат	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Аммония тартрат	–	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Сахароза	2	2	2	2	–	–	7	7	7	7	7	7
Фруктоза	–	–	–	5	7	–	–	–	–	–	–	–
Мочевина	–	–	–	–	–	–	–	–	7	–	–	–
Тиомочевина	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	7	7
Аммония хлорид	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7

\* ГРМ – гидролизат рыбной муки, АС – аммония сульфат, АТ – аммония тартрат, ФС – фруктоза и сахароза, ГК – гидролизат казеина, ДЭ – дрожжевой экстракт, ДС – ДЭ и сахароза, ГКД – ГК и ДЭ, М – мочевина, Т – тиомочевина, АХ – аммония хлорид.

казатели pH на момент определения находились в пределах 6,5–7,5 ед., а при добавлении 6%-й перекиси водорода к ферментату (1:1) происходило интенсивное выделение водорода в виде пенообразования, то КЖ брали в переработку.

**Выделение АМВ** проводили по методу, описанному в статье [23]. Для этого пробы КЖ *B. subtilis* П19 разделяли центрифугированием (5000 об./мин), а супернатанты концентрировали в 5–10 раз упариванием под вакуумом при температуре 50–60°C на ротационном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия). Далее по 35 мл сконцентрированных супернатантов смешивали с 8,8 мл н-бутанола (1/4 часть от объема) 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, и высушивали в шкафу при температуре 105°C до полного удаления растворителя. Преципитат растворяли в небольшом объеме фосфатного буфера, позволяющего получить прозрачный раствор АМВ, и далее очищали пропусканием через хроматографическую колонку С18.

**Тестирование АМВ.** Титр активности АМВ определяли нанесением по 10 мкл последовательных разведений (1:1) на свежесазеянные газоны индикаторных штаммов грамположительных бактерий (листерии, бациллы). Устойчивость к нагреву проверяли кипячением образца (10 мин), конвективным высушиванием (+105°C, 20 мин). Устойчивость к действию протеолитических ферментов исследовали в условиях, имитирующих физиолого-биохимические параметры процесса пищеварения человека и животных [24, 25]. Молекулярную массу оценивали методами электрофореза в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%) с пептидными маркерами PageRuler™ Low Range и масс-спектропии по MALDI-TOF.

**Генетические анализы.** ДНК извлекали из ночной культуры *B. subtilis* с использованием набора геномной ДНК (Promega Corp., Madison, WI, США), ЭДТА (0,5 моль/л, pH 8,0), лизоцима (20 мг/мл), протеиназы К (20 мг/мл) и мутанолизина (2,5 Ед/мкл). Полученную ДНК очищали с помощью спиновых колонок и элюировали в 100 мкл воды, не содержащей нуклеаз. Для выявления бактериоцинов

*B. subtilis* был проведен ПЦР-анализ, в котором использовали праймеры генома *B. subtilis* (GenBank AJ430547) для специфического распознавания функциональных генов субтилина (*spaS*) и субтилозина (*sboA*).

**Математическая обработка результатов.** Статистическая обработка результатов проводилась с определением стандартного отклонения [26] с использованием программы Excel 2016. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая  $p > 0,05$  за достоверный уровень значимости.

## Результаты исследований

**Морфология.** Бактерии *B. subtilis* П19 палочковидные, грамположительные, имеют размер 2–4 × 0,4–0,6 мкм, после деления остаются соединенными в короткие цепи (рис. 1). В клетках просматриваются проспоры, которые не раздувают клетку бактерии и располагаются в ее центре. Клетки подвижные, с перитрихальным расположением жгутиков. Споры овальные, не превышающие размер клетки, расположены преимущественно центрально.

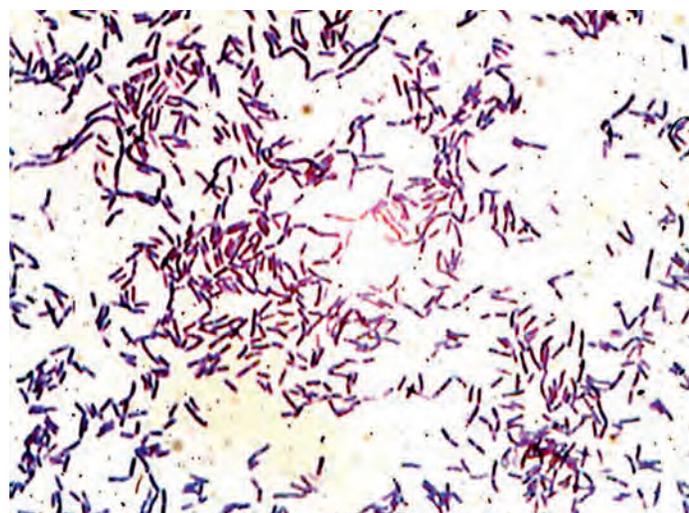


Рис. 1. Морфология клеток штамма *B. subtilis* П19, выращенных при 36°C на ГРМ-агаре в течение суток. Окраска по Граму, ×1250. Микроскоп модели Eclipse E200 (Nikon, Китай).

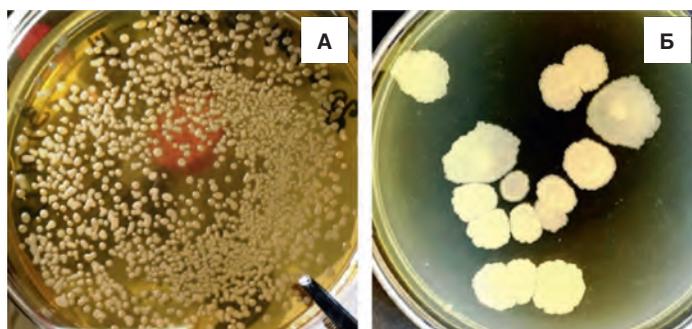
Таблица 2. Активность супернатантов КЖ в зависимости от среды роста штамма

Вариант среды роста*	Диаметр зоны ингибирования тест-штамма, мм		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
ГРМ	Следы	6 ± 0,5	19 ± 2
АС	0	0	12 ± 1
АТ	0	0	10 ± 1
ФС	0	0	6 ± 1
ГК	3	11 ± 0,5	24 ± 3
ДЭ	0	5 ± 0,5	13 ± 1
ДС	0	7 ± 2	18 ± 2
ГКД	4 ± 0,5	15 ± 1	27 ± 3
М	0	14 ± 2	20 ± 2
Т	0	10 ± 1	7 ± 1
АХ	0	0	15 ± 2

\* ГРМ – гидролизат рыбной муки, АС – аммония сульфат, АТ – аммония тартрат, ФС – фруктоза и сахароза, ГК – гидролизат казеина, ДЭ – дрожжевой экстракт, ДС – ДЭ и сахароза, ГКД – ГК и ДЭ, М – мочевины, Т – тиомочевина, АХ – аммония хлорид.

**Культуральные свойства.** Штамм *B. subtilis* П19 хорошо растет на агаризованных питательных средах промышленного изготовления, включая ГРМ-агар («Питательные среды», Оболенск), крахмальный агар (HiMedia, Индия). Оптимум роста  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , а оптимальная продолжительность глубинного выращивания в колбах при 120–150 об./мин составила 18 ч. Суточные колонии штамма выпуклой округлой формы, светло-бежевые (рис. 2а), легко снимаются с поверхности агара при помощи бактериологической петли. Одиночные колонии быстро разрастаются на питательном агаре, достигая за 3 суток 10–20 мм в диаметре (рис. 2б). При этом они не высыхают, оставаясь на вид увлажненными. Клетки штамма предпочитают расти в аэробных условиях с интенсивной продукцией каталазы.

**Физиолого-биохимические свойства.** Бактерии штамма ферментируют глюкозу, сахарозу, маннит и мальтозу. Дают положительную реакцию Фогес–Проскауэра, гидролизуют крахмал, желатину, не гидролизуют мочевины, утилизируют цитрат натрия с глюкозой, не используют пропионат и малонат натрия, не расщепляют тирозин. Вырабатывают каталазу, протеазы, амилазу, не образуют лецитиназу, уреазу и липазу. Редуцируют нитраты, не образуют газ на среде с нитратами в анаэробных условиях, не образуют индол и сероводород. В процессе аэробного культивирования клетки

Рис. 2. Морфология колоний штамм *B. subtilis* П19, выращенных при  $36^\circ\text{C}$  на ГРМ-агаре. А – суточная, Б – трехсуточная чашка.

выделяют в окружающую среду соединения, ингибирующие рост некоторых штаммов грамположительных микроорганизмов – *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterococcus*. Штамм устойчив к полимиксину, лизоциму, чувствителен к пенициллину, стрептомицину, эритромицину, тетрациклину и новобиоцину.

Штамм может храниться без потери свойств при температуре  $5\text{--}10^\circ\text{C}$  на ГРМ-агаре не менее 6 мес. с обязательным пересевом не реже 1 раза в 2 мес., в замороженном виде при  $-10^\circ\text{C}$  – не менее 12 мес. Для длительного хранения штамма предпочтительна лиофилизация.

**Выбор питательной среды и условий биосинтеза АМВ.** В экспериментах по выбору компонентного состава питательной среды было установлено, что пропись в составе гидролизата казеина, дрожжевого экстракта и сахарозы с добавками солей магния (ГКД) показала самые высокие результаты по биосинтезу штаммом АМВ в условиях глубинного культивирования (табл. 1, 2). Кроме того, из клеток, выросших на этой среде, элюирование АМВ происходило более полно, что и определило ее использование во всех последующих экспериментах.

**Выбор условий выделения АМВ из КЖ.** На получение образцов АМВ из КЖ *B. subtilis* П19 по методу Babasaki [23] уходило более суток, к тому же использовалось токсическое вещество *n*-бутанол. Согласно [27], предельно допустимая (среднесменная, за 8 ч) концентрация паров этого вещества составляет  $10 \text{ мг/м}^3$ , а максимальная разовая –  $30 \text{ мг/м}^3$ . Чтобы повысить производительность процесса и минимизировать вредное воздействие растворителей на организм человека, нами предпринята попытка разработать новый метод выделения АМВ из *B. subtilis* П19.

Суть разработки состояла в использовании эффекта центрирования бактериоцина на клетках продуцента в кислой среде, ранее описанного в литературе [28]. Для этого КЖ закисляли соляной кислотой до 2,5–2,7 ед., центрифугировали, супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в небольшом объеме воды, а концентрат раскисляли щелочью до нейтральных значений. Затем его обрабатывали  $96^\circ\text{C}$ -м этанолом (1:1) и вновь центрифугировали, а водно-спиртовой супернатант досуха упаривали. Полученный преципитат растворяли в фосфатном буфере и далее тестировали для определения природы АМВ. Это позволяло, во-первых, снизить объемы перерабатываемых жидкостей, во-вторых, отказаться от использования токсического растворителя и, в-третьих, сократить время выделения АМВ из КЖ.

Сравнительный анализ описанного в литературе и разработанного нами метода [29] показал существенное его преимущество по времени и безопасности осуществления. Использование приема закисления КЖ и смыва этанолом осевшего на клетках бактериоцина занимало не более 5 ч, тогда как по удельной активности пробы АМВ, полученные существующим и ранее описанным методами, были сопоставимы – в среднем по  $6400 \text{ АЕ/мл}$ . При этом выход целевого вещества в виде водного раствора без обработки бутанолом составлял 89,6% (табл. 3).

**Изучение состава АМВ.** После проведения масс-спектрографии образцов АМВ методом MALDI-TOF в нем были выявлены два вещества пептидной природы с пиками в 3,4 и 5,9 кДа (рис. 3). На спектрограмме MALDI-TOF ука-

Таблица 3. Показатели АМВ по активности и выходу в процессе выделения по [29]

Образец и его объем, мл	Антимикробная активность		Выход, %	
	АЕ/мл	АЕ/на объем образца		
КЖ	1000	150 ± 50	150000	100
Супернатант бесклеточный	980	15	14700	9,8
ЭКП после удаления спирта и разведения в воде	21	6400	134400	89,6

ЭКП – экстракт клеточной поверхности; АЕ – арбитражные единицы. В качестве индикаторного штамма использовали *L. monocytogenes* 766.

занные пики полностью исчезали после обработке пробы АМВ протеолитическими ферментами, что указывает на их белковую природу. В то же время антимикробные свойства обнаруженных веществ оставались пока неизвестными. Для ответа на этот вопрос был проведен гель-электрофорез АМВ в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%). Последующее биотестирование гелевой пластины на индикаторном штам-

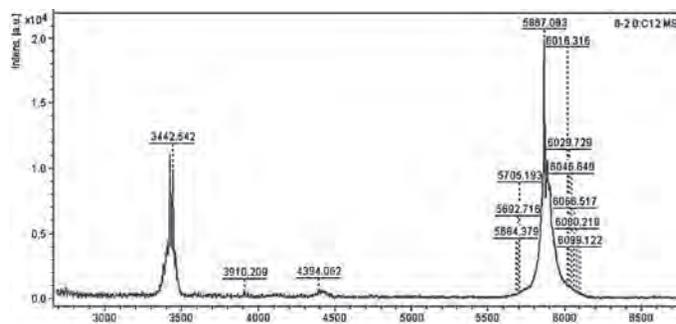


Рис. 3. Данные масс-спектрологии методом MALDI-TOF в процессе выделения АМВ *B. subtilis* П19 после экстракции этанолом.

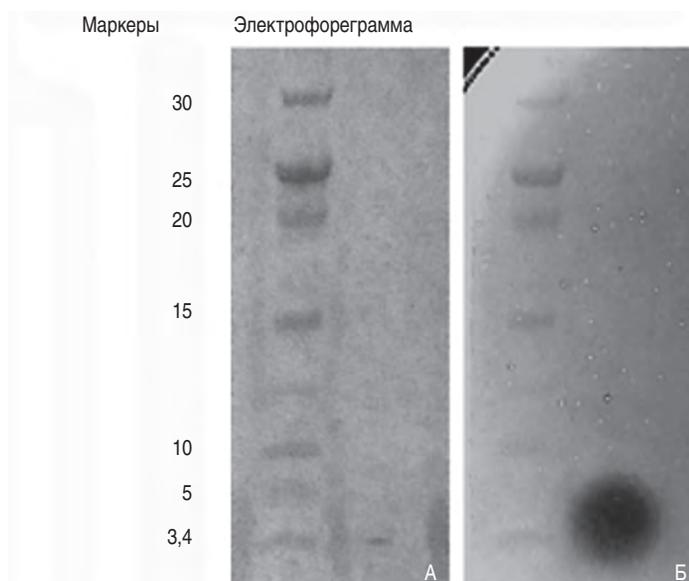


Рис. 4. Гель-электрофорез АМВ *B. subtilis* П19 в системе Tris-tricine SDS-PAGE (18%) с последующим биотестированием гелевой пластины на *L. monocytogenes* 766, позволяющим определить молекулярную массу активной фракции. Использовали пептидные маркеры PageRuler™ Low Range, кДа; а – ПААГ с BS после окраски Coomassie brilliant blue G250.

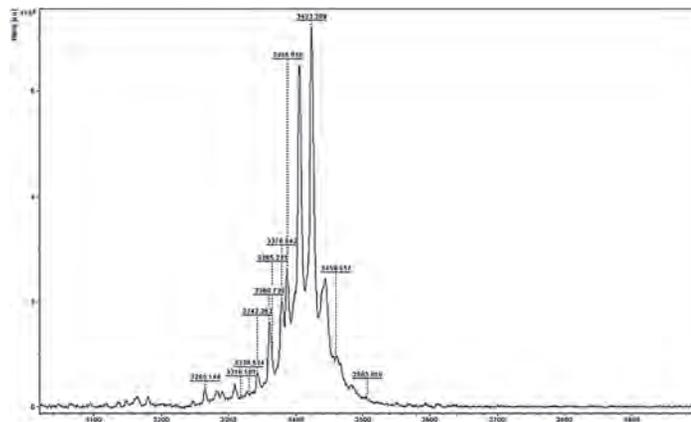


Рис. 5. Результат масс-спектрологии методом MALDI-TOF образца пептида, выделенного из АМВ после обработки н-бутанолом, демонстрирующий наличие пика в 3,4 кДа, который соответствует субтилизину А.

ме позволило выявить лишь один активный пептид с молекулярной массой 3,4 кДа (рис. 4).

**Выделение активной фракции.** Для получения целевого вещества из смеси пептидов 2 мл водной взвеси АМВ в стеклянном флаконе на 20 мл с активностью 6400 АЕ/мл развели до 10 мл, перемешивали 5 мин. Во флакон вносили 2,5 мл н-бутанола, в течение 20 мин гомогенизировали на вортексе и затем центрифугировали (4000 об./мин) 30 мин. Образующий органический слой собирали пипеткой и высушивали в стеклянной чашке при 70°C. Образовавшейся желтый преципитат ресуспендировали в 2 мл 50%-го диметилсульфоксида ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) и подвергали хроматографической очистке на концентрирующем патроне ДИАПАК С-18 («Биохиммак», Россия). Элюирование начинали с 20% ацетонитрила (Ацн) в течение 5 мин, затем увеличивали до 50% Ацн в течение 20 мин и в конце снижали до 20% Ацн в течение 5 мин.

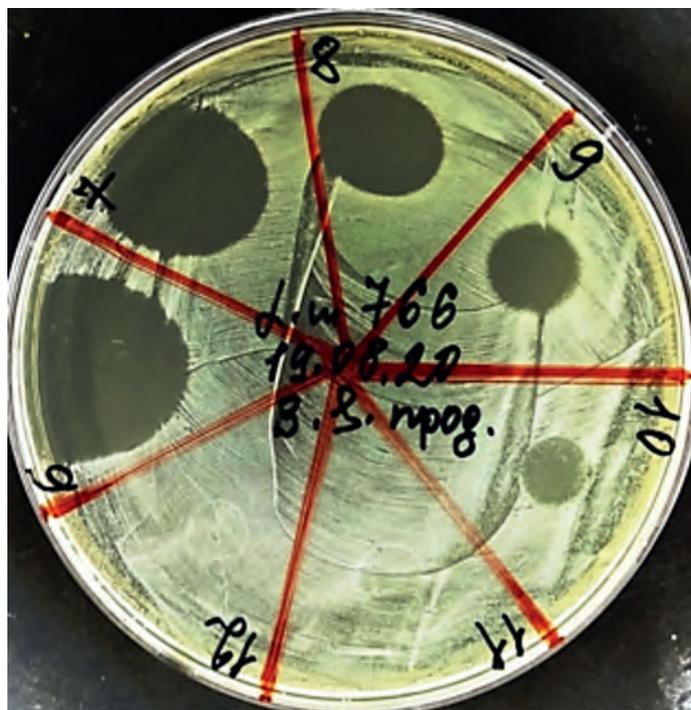


Рис. 6. Чашки с результатами определения титра антимикробной активности пробы очищенного бактериоцина *B. subtilis* П19, составляющей 102 400 АЕ/мл.

Таблица 4. Оценка активности бактериоцина *B. subtilis* П19 на некоторые микроорганизмы

Штаммы микроорганизмов	Наличие или отсутствие активности
<i>Bacillus alvei</i> ИПМ 1555	++++
<i>B. anthracis</i> 71/12	++++
<i>B. anthracis</i> СТИ 1	++++
<i>B. cereus</i> 164	++++
<i>B. cereus</i> 1070	++++
<i>B. megaterium</i> 321	++++
<i>B. thuringiensis</i> 1373	++++
<i>B. thuringiensis</i> 214	++++
<i>L. monocytogenes</i> 766	++++
<i>L. monocytogenes</i> BB1	++++
<i>L. ivanovi</i> 20751T	++++
<i>M. luteus</i> 59	++++
<i>M. caseolyticus</i> 38	++++
<i>S. aureus</i> 93R	+++
<i>S. aureus</i> (15 штаммов из птиц)	++ (на 7 штаммов)
<i>E. coli</i> R3	-
<i>E. coli</i> M17	±
<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Salmonella choleraesuis</i> 68	-

Диаметры зон подавления роста бактерий от 10 мкл пробы: (+) – 3–5 мм; (++) – 6–8 мм; (+++) – 8–10 мм; (++++) – >10 мм; (±) – неясный результат; (-) – отсутствие результата.

Получаемый на выходе продукт представляет собой по данным MALDI-TOF (рис. 5) пептид с молекулярной массой 4,3 кДа, как у субтилозина А [23, 30], с активностью 25600 АЕ/мл против *L. monocytogenes* (рис. 6).

Изучение свойств выделенного бактериоцина. Бактериоцин *B. subtilis* П19, как следует из данных табл. 4, проявлял активность в отношении всех бактерий родов

Таблица 5. Физико-химические свойства грубого бактериоцина *B. subtilis* П19

Факторы	Значения	Активность, АЕ/мл		Потеря активности, %
		Исходная	Конечная	
рН	1,5–2,0	6400	3200	50
	2,5–3,5		3200–6400	25
	6,0–8,0		6400	0
	9,0–10,0		6400	0
	11,0–12,0		1600	75
Кипячение	10 мин	6400	6400	0
	30 мин		3200	50
Сухожаровой нагрев в течение 20 мин	при 70–80°C	6400	6400	0
	при 90–100°C		6400	0
	при 110°C		1600–3200	62
Обработка Панзинорм* форте 20000 (ЛС– 001355) при 37°C (1:1)	1,0 ч	6400	800	87,5
	2,0 ч		200	96,9
	3,0 ч		<100	>98,4

(\* ) Фермент убивали нагревом пробы до 90°C в течение 10 мин.

*Bacillus*, *Listeria*, *Micrococcus luteus* и некоторых штаммов *S. aureus*. В то же время на грамотрицательные микроорганизмы он не действует, что характерно для всех бактериоцинов группы лантибиотиков [14, 15].

Из данных табл. 5 видно, что бактериоцин *B. subtilis* П-19 выдерживает кипячение (10 мин), сухожаровой нагрев (+105°C, 20 мин), но разрушается в условиях, имитирующих физиолого-биохимические параметры процесса пищеварения человека и животных.

Определение наличия генов, ответственных за синтез бактериоцинов.

Кластер генов, ответственных за синтез субтилина *B. subtilis* (*spaB*, *spaT*, *spaC*, *subtilin* (*spaS*), *spaI*, *spaF*, *spaE*, *spaG*, *spaR*, *spaK* и *YvaN* (GenBank: U09819.1)), не обнаружен. Результаты предварительных исследований подтверждают наличие в штамме *B. subtilis* П19 кластера генов *sbo-alb* (локус BSU\_37350), ответственных за продукцию субтилозина А. Данный кластер состоит из генов *sboAalbABCDEFGF*, организованных в 7 кб оперон [30, 31].

## Заключение

Бактериоцины считаются потенциальной альтернативой традиционным антибиотикам, и в мире они уже используются в качестве естественных консервантов для пищевой и фармацевтической индустрии. Они представлены низкомолекулярными пептидами, которые синтезируются на рибосомах бактерий и обладают способностью убивать чувствительные к ним микробы по механизму образования пор в мембранах.

Антагонистически активный штамм П19, изолированный нами в 2019 г. из растительной массы пассифлоры, на основе биохимических (API-50В, Biomerieux), масс-спектроскопических (Maldi Biotyper) и филогенетических (16S rRNA gene sequencing) тестов был идентифицирован как *B. subtilis*. Синтезируемое им в условиях глубокого культивирования АМВ выделяется из супернатанта КЖ следующим образом. КЖ закисляют до рН 2,5 и разделяют центрифугированием, осадок клеточной массы ресуспендируют в небольшом объеме воды с восстановлением рН (7,0) и обработкой ее этанолом (1:1). После этого смесь разделяют центрифугированием, супернатант упаривают, преципитат растворяют в фосфатном буфере. В результате масс-спектрологии (MALDI TOF-MS) показано присутствие в полученной смеси двух веществ с молекулярной массой 3,4 и 5,9 кДа.

С помощью методов электрофореза проб и последующего биотестирования полиакриламидной гелевой пластины показано, что антимикробной активностью обладает лишь пептид с молекулярной массой 3,4 кДа. Был отработан способ выделения активного вещества из смеси пептидов и определена его удельная активность. Так, молекулярная масса этого пептида была как у субтилозина А – одного из 6 бактериоцинов сенной палочки [18–21], тогда как активность составила 102400 АЕ/мл. Пептид переносит кипячение, перепады рН в широком диапазоне (2–10 ед.), но разрушается протеолитическими ферментами, что свойственно лантибиотикам – группе бактериоцинов класса I. Он активен в отношении таких групп патогенных бактерий, как *B. anthracis*, *B. cereus*, *S. aureus* и *L. monocytogenes*.

Найденный продуцент и синтезируемый им бактериоцин является еще одним из природных источников пополнения номенклатуры антимикробных веществ – альтернативы антибиотикам [32].

#### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

#### Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

#### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

#### Благодарности

Авторы благодарны техническому персоналу, лаборантам отдела биологических технологий и отдела коллекционных культур за обслуживание лабораторного оборудования, обеспечение материалами и средами для этого исследования.

#### Gratitude

The authors are grateful to the technical staff of the Department of Biological Technologies and the Department of Collection Cultures for maintaining laboratory equipment, providing materials and media for this study.

#### Литература

- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(4):845-57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Giessen TW, Marahiel MA. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett.* 2012 Jul 16;586(15):2065-75. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.017
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976 Sep;40(3):722-56. DOI: 10.1128/br.40.3.722-756.1976
- Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jan;304(1):51-62. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003
- Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 2002 May-Jun;84(5-6):577-92. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01414-1
- Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937
- Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(6):641-58. DOI: 10.1080/10408398.2011.553752
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
- Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:117-37. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
- Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS One.* 2012;7(3):e31498. DOI: 10.1371/journal.pone.0031498
- Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Nov;81(22):7914-23. DOI: 10.1128/AEM.02392-15
- Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
- Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор). *Сельскохозяйственная биология.* 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus
- Патент РФ № 2553547. Штамм *Bacillus subtilis*, вырабатывающий пептид с противомикробной активностью, и способ ингибирования нежелательных микроорганизмов в материале с использованием штамма. Дата публикации: 20.10.2014 Бюл. №29. Опубликовано: 20.06.2015. Бюл. №17.
- Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Apr;80(8):2633-43. DOI: 10.1128/AEM.03751-13
- Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015 Feb;61(2):93-103. DOI: 10.1139/cjm-2014-0613
- Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Jan;35(1):201-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
- Fickers P. Antibiotic compounds from so *Bacillus*: why are they amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2012;8(1):38-43. DOI: 10.3844/ajbbbsp.2012.38.43
- Barbosa J, Caetano T, Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *J Nat Prod.* 2015 Nov 25;78(11):2850-66. DOI: 10.1021/np500424y
- Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, et al. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2013 Jun 3;11(6):1878-98. DOI: 10.3390/md11061878
- 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 Biochem.* 1985 Sep;98(3):585-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135315
- Дармов ИВ, Чичерин ИЮ, Ердякова АС, Погорельский ИП, Лундовских ИА. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях *in vitro*. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2011;9:96-101.
- Мальшева НВ, Науменко ОА, Фомина МВ. Биохимия пищеварения и питания: методические указания к лабораторному практикуму. Оренбург: ОГУ; 2011, 42 с.
- Платонов АЕ. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМ; 2000.
- Роспотребнадзор. №418. Бутан-1-ол (бутиловый спирт). ГН 2.2.5.3532-18 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» (рус.). Утверждены Поповой АЮ. М., 2018.
- Yang R, Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 1994;11:281-91.
- Похиленко ВД, Перельгин ВВ, Калмантаев ТА, Детушев КВ, Чукина ИА. Антимикробные свойства пептидной субстанции *Bacillus subtilis* ПСФ-19. *Интерактивная наука.* 2019;9(43):22-26. DOI: 10.21661/r-508120

30. Huang T, Geng H, Miyapuram VR, Sit CS, Vederas JC, Nakano MM. Isolation of a variant of subtilosin A with hemolytic activity. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5690-6. DOI: 10.1128/JB.00541-09
31. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol.* 1999 Dec;181(23):7346-55. DOI: 10.1128/JB.181.23.7346-7355.1999
32. Ефименко ТА. Бактериальные продуценты антибиотиков, активных в отношении микроорганизмов с лекарственной устойчивостью. Дисс. М., 2018, 140 с.

## References

1. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005 May;56(4):845-57. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
2. Giessen TW, Marahiel MA. Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett.* 2012 Jul 16;586(15):2065-75. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.017
3. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
4. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev.* 1976 Sep;40(3):722-56. DOI: 10.1128/br.40.3.722-756.1976
5. Dischinger J, Basi Chipalu S, Bierbaum G. Lantibiotics: promising candidates for future applications in health care. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jan;304(1):51-62. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.09.003
6. Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie.* 2002 May-Jun;84(5-6):577-92. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01414-1
7. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013 Feb;11(2):95-105. DOI: 10.1038/nrmicro2937
8. Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(6):641-58. DOI: 10.1080/10408398.2011.553752
9. Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.* 2014 May 26;5:241. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00241
10. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:117-37. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
11. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993 Sep;12(1-3):39-85. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x
12. Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, purification and characterization of laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS One.* 2012;7(3):e31498. DOI: 10.1371/journal.pone.0031498
13. Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Nov;81(22):7914-23. DOI: 10.1128/AEM.02392-15
14. Parisot J, Carey S, Breukink E, Chan WC, Narbad A, Bonev B. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):612-8. DOI: 10.1128/AAC.00836-07
15. Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms. *Agricultural Biology.* 2018;53(1):29-37. DOI: 10.15389/agrobiol.2018.1.29rus (In Russian).
16. RF Patent No 2553547. A strain of *Bacillus subtilis* that produces a peptide with antimicrobial activity and a method for inhibiting undesirable microorganisms in the material using the strain. Date of publication: 20.10.2014 Byul. No 29. Published: 20.06.2015. Byul. No 17. (In Russian).
17. Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. Cerecidins, novel lantibiotics from *Bacillus cereus* with potent antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2014 Apr;80(8):2633-43. DOI: 10.1128/AEM.03751-13
18. Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015 Feb;61(2):93-103. DOI: 10.1139/cjm-2014-0613
19. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Jan;35(1):201-32. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x
20. Fickers P. Antibiotic compounds from so *Bacillus*: why are they amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 2012;8(1):38-43. DOI: 10.3844/ajbbsp.2012.38.43
21. Barbosa J, Caetano T, Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. *J Nat Prod.* 2015 Nov 25;78(11):2850-66. DOI: 10.1021/np500424y
22. Phelan RW, Barret M, Cotter PD, O'Connor PM, Chen R, Morrissey JP, et al. Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Mar Drugs.* 2013 Jun 3;11(6):1878-98. DOI: 10.3390/md11061878
23. 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 Biochem.* 1985 Sep;98(3):585-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135315
24. Darmov IV, Chicherin IYu, Erdyakova AS, Pogorelsky IP, Lundovskikh IA. Comparative assessment of survival of probiotic microorganisms from commercial preparations under the conditions *in vitro*. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2011;9:96-101. (In Russian).
25. Malysheva NV, Naumenko OA, Fomina MV. Biochemistry of digestion and nutrition: guidelines for laboratory practice. Orenburg, 2011, 42 p. (In Russian).
26. Platonov AE. Statistical analysis in medicine and biology: terminology, logic, computer methods.. Moscow, 2000. (In Russian).
27. Rospotrebnadzor. No 418. Butane-1-ol (butyl alcohol). GN 2.2.5.3532-18 "Maximum permissible concentrations (MPC) of harmful substances in the air of the working area" (rus.). Approved by Popova AYU. Moscow, 2018. (In Russian).
28. Yang R, Ray B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 1994;11:281-91.
29. Pokhilenko VD, Pereygin VV, Kalmantaev TA, Detushev KV, Chukina IA. Antimicrobial properties of the peptide substance *Bacillus subtilis* PSF-19. *Interactive Science.* 2019;9(43):22-26. DOI: 10.21661/i-508120 (In Russian).
30. Huang T, Geng H, Miyapuram VR, Sit CS, Vederas JC, Nakano MM. Isolation of a variant of subtilosin A with hemolytic activity. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5690-6. DOI: 10.1128/JB.00541-09
31. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilosin. *J Bacteriol.* 1999 Dec;181(23):7346-55. DOI: 10.1128/JB.181.23.7346-7355.1999
32. Efimenko TA. Bacterial producers of antibiotics active against drug-resistant microorganisms. Diss. Moscow, 2018, 140 p. (In Russian).

### Информация об авторах:

Калмантаев Тимур Ахмерович, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Кисличкина Ангелина Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Мухина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Чукина Ирина Анатольевна, инженер отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

**Information about authors:**

Timur A. Kalmantaev, PhD (Biological Sciences), Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Igor A. Dunaytsev, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Konstantin V. Detushev, Junior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Angelina A. Kislichkina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Tat'yana N. Mukhina, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Collection Cultures Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Irina A. Chukina, Engineer of Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

## Изменение климата и экстремальные погодные условия окажут комплексное воздействие на передачу болезней

Хорошо известно, что взаимодействия между патогенами и их хозяевами чувствительны к изменениям температуры. Предполагают, что изменение климата повысит не только средние температуры, но и температурные колебания, а также частоту и интенсивность экстремальных погодных явлений.

В настоящее время изучено влияние повышения средней температуры на характер взаимодействия хозяина и патогена, влияние переменных температурных режимов, таких как волны тепла, остается в значительной степени неизвестным.

Ученые изучили влияние различных температур на свойства организма-хозяина – небольшого ракообразного под названием *Daphnia magna* – и его известного кишечного паразита *Odospora colligata*. Передача паразита представляет собой классическую передачу через окружающую среду, аналогичную той, которая наблюдается при таких заболеваниях, как COVID-19 и холера.

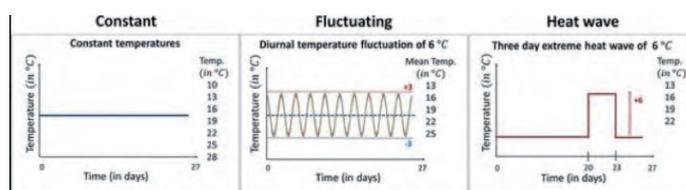
Исследовали, как организмы реагировали на три различных температурных режима: постоянная температура и два переменных режима с суточными колебаниями +/- 3 градуса по Цельсию и трехдневными волнами тепла на 6 градусов по Цельсию выше температуры окружающей среды. Затем измерялась продолжительность жизни ракообразных, плодовитость, инфекционный статус и количество спор паразитов в их кишечнике. Полученные данные обработали в статистической модели, чтобы сравнить влияние трех различных температурных режимов.

Установлено, что ежедневные колебания температуры снижают заразность и споровую нагрузку паразита по сравнению с теми, кто содержался при постоянной средней температуре. Однако, напротив, заразность паразитов после аномальной жары была почти такой же, как у паразитов, содержащихся при постоянной температуре.

Более того, количество спор в рачке-хозяине увеличилось после трехдневной «аномальной жары», когда фоновая постоянная температура составляла 16 градусов Цельсия, но это бремя уменьшалось при более высоких температурах. Это говорит о том, что эффекты изменения температуры различаются в зависимости от средней фоновой температуры и от того, близка ли она к оптимальной температуре для паразита.

Приспособленность хозяина и репродуктивный успех, как правило, снижались у ракообразных, подвергшихся воздействию спор паразита или при воздействии переменных температур. Разница между реакцией хозяина и патогена позволяет предположить, что при некоторых обстоятельствах паразиты были способны выдерживать внезапную смену тепла лучше, чем их хозяева.

Итак, изменение температуры сложным образом изменяет результат взаимодействия хозяина и патогена. Мало того, что изменение температуры по-разному влияет на разные черты хозяина и патогена, но также тип изменения и средняя температура, к которой оно применяется. Это означает, что изменение моделей колебаний климата, наложенное на сдвиги средних температур из-за глобального потепления, может иметь глубокие и непредвиденные последствия для динамики заболеваний.



Kunze C., et al.. Alternate patterns of temperature variation bring about very different disease outcomes at different mean temperatures // eLife. 2022. T. 11. C. e72861.