DOI: 10.20953/2500-1027-2026-2-17-24

Бактериология, 2026, том 11, №2, с. 17–24
Bacteriology, 2026, volume 11, No 2, p. 17–24

Генетическая характеристика мундтицина P436 и оценка штамма *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925 в качестве его промышленного продуцента

М.Г.Теймуразов, А.А.Абаимова, И.М.Коваленко, О.И.Тазина, А.А.Кисличкина

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

В работе проведена оценка биологической безопасности штамма *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925, выделенного из респираторного тракта цыплят-бройлеров. С использованием полифазного подхода (MALDI-TOF MS, полимеразной цепной реакции и WGS) подтвержден таксономический статус штамма. Геномный анализ (NCBI WGS project JAIZFT01) выявил отсутствие приобретенных генов антибиотикорезистентности, факторов вирулентности, профагов и систем синтеза биогенных аминов, что подтверждает статус безопасности штамма. Установлено наличие полнофункционального оперона мундтицина P436 (*munA-munI-lanT*). Впервые для данного вида описан сложный биосинтетический локус RiPPs-пептида, включающий радикальную SAM-матуразу (BmbF) и структурный пре-пептид (34 а.о.), гомологичный системе синтеза редокс-кофактора микофактоцина. Сочетание доказанной безопасности, продукции бактериоцина класса IIa и уникального метаболического потенциала делает штамм SCPM-O-B-8925 перспективным кандидатом для разработки постбиотических препаратов и штаммом-продуцентом для получения биоконсерванта (мундтицина P436) для использования в пищевой промышленности.

Ключевые слова: Enterococcus mundtii, полногеномное секвенирование, мундтицин KS, мундтицин P436, микофактоцин, биобезопасность, биоконсервант, бактериоцин класса IIa, RiPPs, штамм-продуцент

Для цитирования: Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Коваленко И.М., Тазина О.И., Кисличкина А.А. Генетическая характеристика мундтицина P436 и оценка штамма *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925 в качестве его промышленного продуцента. Бактериология. 2026; 11(2): 17–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-2-17–24

Genetic characterization of mundticin p436 and evaluation of *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925 strain as it`s industrial producer

M.G.Teymurazov, A.A.Abaimova, I.M.Kovalenko, O.I.Tazina, A.A.Kislichkina

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

The study evaluates the biological safety of the strain *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925, isolated from the respiratory tract of broiler chicks. The taxonomic status of the strain was confirmed using a polyphasic approach (MALDI-TOF MS, PCR, and WGS). Genomic analysis (NCBI WGS project JAIZFT01) revealed an absence of acquired antibiotic resistance genes, virulence factors, prophages, and biogenic amine synthesis systems, confirming the safety of the strain. The presence of a fully functional mundycin R436 operon (*munA-munI-lanT*) was established., A complex biosynthetic locus for a RiPPs peptide was described for the first time for this species, including a radical SAM maturase (BmbF) and a structural pre-peptide (34 a.a.) homologous to the mycofactin redox cofactor synthesis system. The combination of proven safety, production of class IIa bacteriocins, and unique metabolic potential makes strain SCPM-O-B-8925 a promising candidate for the development of postbiotic preparations and as a strain-producer for obtaining a biopreservative (mundycin R436) for use in the food industry.

Key words: Enterococcus mundtii, whole-genome sequencing, mundticin KS, mundticin P436, mycofactocin, biosafety, biopreservative, class IIa bacteriocin, RiPPs, producer strain

For citation: Teymurazov M.G., Abaimova A.A., Kovalenko I.M., Tazina O.I., Kislichkina A.A. Genetic characterization of mundticin p436 and evaluation of *Enterococcus mundtii* SCPM-O-B-8925 strain as it`s industrial producer. Bacteriology. 2026; 11(2): 17–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-2-17-24

Для корреспонденции:

Теймуразов Марат Георгиевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
E-mail: teymurazov@obolensk.org
ORCID: 0000-0002-8635-8366

Статья поступила 14.05.2026, принята к печати 30.06.2026

For correspondence:

Marat G. Teymurazov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
E-mail: teymurazov@obolensk.org
ORCID: 0000-0002-8635-8366

The article was received 14.05.2026, accepted for publication 30.06.2026

Бактериоцины – низкомолекулярные антимикробные пептиды, секретируемые бактериями для уничтожения, как правило, близкородственных видов в одной экологической нише с целью получения преимуществ в борьбе за питательные вещества. Род *Enterococcus* spp. является одним из наиболее продуктивных по количеству обнаруженных и охарактеризованных бактериоцинов. На сегодняшний день известно не менее 30 бактериоцинов, выделенных из энтерококков, включающих все 3 класса современной классификации [1–3].

Хорошая изученность известных энтероцинов, особенно класса IIa (PLB – педиоцин-подобные бактериоцины), облегчает задачу по доказательствам эффективности и безопасности полученного продукта. Один из представителей PLB – мундтицин, продуцируемый *Enterococcus mundtii*, слабо иммуногенный и нетоксигенный для человека и животных (мундтицины AT06, CRL35, CUGF08, KS [4–7], а также представленный в нашей работе мундтицин P436).

Бактериоцины PLB являются привлекательным объектом для использования в пищевой промышленности. Они не имеют цвета, вкуса и запаха, стабильны при низком pH, высокой температуре и в широком диапазоне концентраций солей [8, 9].

«Узким местом» внедрения бактериоцинов в практику в качестве биоконсервантов является их низкий выход при культивировании штаммов-продуцентов, который зачастую не превышает 1–2 мг/л, а последующая очистка уменьшает их концентрацию еще в несколько раз, что сводит на нет привлекательность их использования. Недавно нами была показана возможность значительного увеличения индукции мундтицина P436 (в 3 раза по сравнению с контролем) и последующей одностадийной очистки. Чистота полученного мундтицина составляла ~70% с выходом не менее 25 мг/л [10]. Мы считаем, что эти результаты позволят использовать мундтицин в промышленности за счет простоты технологии и увеличения индукции. Кроме того, подобная технология, очевидно, будет пригодна для всех энтероцинов подкласса IIa. Однако существует еще одна большая проблема, которую следует решить перед внедрением энтероцинов в практику, – оценить и убедиться в полной безопасности самого штамма-продуцента и продуктов его метаболизма.

Известно, что энтерококки не включены в список QPS (Qualified Presumption of Safety) Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) [11], а также не имеют статуса GRAS [12]. Это обусловлено тем, что в первую очередь *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* вызывают инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, внутрибрюшные инфекции и эндокардит. Они являются третьим по распространенности внутрибольничным патогеном, вызывая 14% внутрибольничных инфекций в США и 5–20% внебольничных эндокардитов [13, 14]. Особую опасность представляют ванкомицин-резистентные штаммы и штаммы с множественной лекарственной устойчивостью [15].

EFSA предложила схему для принятия решения о безопасности пробиотического штамма [11, 16], включающую следующие пункты: 1) отсутствие резистентности к аминогликозидам, β-лактамам, гликопептидам, фениколам, тетрациклинам, ампициллину (≤2 мг/л); 2) отсутствие факторов вирулентности – aggregation substance protein (*asa1*), gelatinase (*gelE*), cytolysin (*cylA*), enterococcal surface proteins (*esp*), hyaluronidase (*hyl*), collagen adhesion protein (*ace*) и endocarditis antigens (*efaA*); 3) отсутствие токсинов – гемолитических и негемолитических эндотоксинов; 4) отсутствие биогенных аминов – фенилентиламина, гистамина, кадаверина, путресцина и триптамина.

Целью нашей работы являлась оценка безопасности штамма *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 как возможного кандидата в штаммы-продуценты для использования полученного мундтицина в качестве биоконсерванта, а также генетическая характеристика локуса синтеза мундтицина P436.

Материалы и методы

Штаммы-продуценты

Штамм *E. mundtii* был выделен из подглазничных синусов птицы при проведении бактериологического исследования на сердечно-мозговом агаре. Полученный штамм был депонирован в музее ГНЦ ПМБ с присвоением номера SCPM-O-B-8925. Рабочие аликвоты штамма хранились в MRS-бульоне (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия) с добавлением 30% глицерина при -70°C. Для экспериментов каждый раз использовались новые аликвоты штаммов, которые высевались на энтерококк-агар (HiMedia, Индия) «штрихом» до единичных колоний.

Видовая идентификация

Анализ штаммов методом масс-спектрометрии. Подготовка образцов проводилась по методике Хуммеля (Hummel). Экстракцию белков выполняли в соответствии с протоколом компании Bruker Daltonics GmbH (Германия). Также применялся метод прямого нанесения культуры на мишень [17]. Обобщение результатов проводилось с помощью программы FlexAnalysis (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Биохимическая идентификация. Использовали карты для идентификации энтерококков, стрептококков, стафилококков и других грамположительных микроорганизмов VITEK® 2 GP на приборе VITEK® 2 (BioMérieux, Франция). Также использовали EN-COCCUStest (Erba Lachema s.r.o., Чехия).

Антибиотикочувствительность

Определение чувствительности к антимикробным препаратам проводили диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтон в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI, 2012). Штаммы тестировали на чувствительность к 15 антибиотикам различных классов: ванкомицин (10 мкг/диск), хлорамфеникол (30 мкг/диск), клиндамицин (10 мкг/диск), ко-тримоксазол (25 мкг/диск), линезолид (10 мкг/диск), амикацин (30 мкг/диск), вирджиниамицин (15 мкг/диск), тобрамицин (10 мкг/диск), тетрациклин (30 мкг/диск), стрептомицин (10 мкг/диск), ампициллин (10 мкг/диск) – все производства HiMedia (Индия); тейкопланин (– 30 мкг/диск), эритромицин (5 мкг/диск), ломефлоксацин (10 мкг/диск), пенициллин G (10 мкг/диск) – производства Bioanalyse (Турция). Анализы выполняли в двух повторах.

Полногеномное секвенирование

Образцы ДНК выделяли с использованием наборов DNeasy UltraClean/NoviPure Microbial Kits (QIAGEN, США). Полногеномное секвенирование проводили на приборе

Таблица 1. **Праймеры, использованные для ПЦР-детекции генов синтеза биогенных аминов**
*Table 1. **Primers used for PCR detection of biogenic amine synthesis genes***

Целевой ген / *Target gene*	Продукт (амин) / *Product (amine)*	Последовательность праймера (5' → 3') / *Primer sequence (5' → 3')*	Tm, °C	Продукт, п.н. / *Product, b.p.*	Ссылка / *Reference*
tyrDC	Тирамин	F: GAYATYATYGGYATYGGYTTYGAYAA R: TCRTCCATYTCRTTRTGRTGRTG	52	~1100	[26]
hdc	Гистамин	F: AGYATYTTYGGYTTYGAYGGY R: TCYTGRTGRAARTARTGRTG	52	~435	[26]
odc	Путресцин	F: GTYGAYMGYMGYTTYTTYTTYGA R: TCYTGRTGRAARTARTGRTG	52	~340	[27]
ldc	Кадаверин	F: GTYAAYGARGAYTAYYTIGAYGA R: GGYTCYTTYTGRAAITCYTTRTC	52	~800	[26]

MGISeq-2000 (MGI Tech Co., Ltd, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Библиотеки ДНК готовили с использованием набора MGIEasy FS DNA Library Prep Kit; секвенирование выполняли согласно протоколам производителя с набором MGI-Seq 2000RS High-throughput sequencing kit PE200. Единичные прочтения, полученные в результате секвенирования, собирали *de novo* без предварительной фильтрации в программе SPAdes v. 1.13.1 с настройками по умолчанию [18]. Аннотацию финальных сборок проводили с помощью сервиса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [19].

Биоинформатический анализ

Собранные геномы проверяли на наличие генов резистентности к антибиотикам с помощью биоинформатических инструментов ResFinder 4.1 и CARD [20]. Поиск генов вирулентности осуществляли в VirulenceFinder 2.0 (Center for Genomic Epidemiology) [21]. Гены бактериоцинов выявляли с помощью программы BAGEL4 [22]. Для видовой идентификации использовали значение средней идентичности нуклеотидов (Average Nucleotide Identity/ANI) рассчитанной с помощью программы pyani (https://github.com/widdowquinn/pyani). Поиск профагов проводили с помощью программы Prophage Hunter [23].

Определение желатиназной активности

Определение продукции желатиназы проводили классическим методом укола в столбик питательного желатина [24]. Использовали питательный желатин (HiMedia, Индия). Суточную чистую культуру энтерококков засевали уколом в столбик 12%-й желатиновой среды в пробирках. Инкубацию проводили при температуре 35–37°С в течение 24–48 ч, а в случае отрицательного результата – до 14 суток. Для оценки гидролиза пробирки охлаждали при +4°С в течение 30–60 мин.

Оценка гемолитической активности

Гемолитическую активность определяли путем посева чистой суточной культуры штаммов на чашки Петри с 5%-м кровяным агаром (на основе Brain Heart Infusion agar, HiMedia, Индия) с добавлением дефибринированной крови барана («ПанЭко», Россия). Посевы инкубировали при температуре 37°С в аэробных условиях в течение 24–48 ч. Интерпретацию результатов проводили визуально по наличию/отсутствию зон гемолиза.

Определение наличия биогенных аминов

Для фенотипического определения использовали метод, предложенный Bover-Cid и Holzapfel [25]. Использовали модифицированную среду декарбоксилирования MRS (HiMedia, Индия), дополненную 0,5% соответствующей аминокислоты-предшественника: L-тирозин (для тирамина), L-гистидин (для гистамина), L-орнитин (для путресцина), L-лизин (для кадаверина) – все производства HiMedia (Индия). В среду добавляли индикатор бромкрезоловый пурпурный до конечной концентрации 0,006% («ЛенРеактив», Россия). Исходный pH среды доводили до 5,3. Посевы инкубировали при 37°С в течение 4–7 суток. Интерпретацию результатов проводили визуально по изменению цвета среды.

Наличие генов, ответственных за синтез биогенных аминов, определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров по протоколам [26, 27]. Состав смеси для ПЦР: 10× буфер, 2,5 мМ MgCl2, 0,2 мМ dNTPs, 0,5 мкМ каждого праймера, 1,25 ед. Taq-полимеразы. Программа амплификации: начальная денатурация 95°С – 5 мин; 30–35 циклов: 94°С – 45 с, 52°С – 45 с, 72°С – 1 мин; финальная элонгация 72°С – 10 мин. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,5%-м (w/v) агарозном геле с визуализацией бромистым этидием в ультрафиолетовом свете (табл. 1).

Результаты исследования и их обсуждение

1. Характеристика штамма SCPM-O-B-8925

Штамм SCPM-O-B-8925, выделенный из респираторной системы цыплят-бройлеров, был классифицирован как *E. mundtii* на основании комплексного подхода, включающего биохимические, масс-спектрометрические (MALDI-TOF) и молекулярно-генетические методы. Результат полногеномного секвенирования в виде сборки генома был депонирован в базу данных NCBI Genome, WGS project – JAIZFT01. Сборка генома штамма SCPM-O-B-8925 состояла из 56 контигов, общая длина генома составила 3 165 767 п.н., GC-состав – 38,30%. Таксономический статус штамма подтвержден результатами полногеномного секвенирования (WGS) с использованием независимых алгоритмов NCBI и ANI. Результаты показали, что геном SCPM-O-B-8925 имеет значение ANI 96,5% по отношению к хромосоме типового референсного штамма *E. mundtii* DSM 4838 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP018061.1). Полученное значение выше порогового значения 95–96% для одного вида бактерий [28].

Анализ антибиотикограммы штамма SCPM-O-B-8925 (табл. 2) показал его чувствительность к 10 из 15 протестированных препаратов, включая ключевые гликопептиды и β-лактамы. Выявленная резистентность к макролидам (эритромицину) и аминогликозидам (амикацину, стрептомицину, тобрамицину) носит фенотипический характер, так как соот-

Таблица 2. **Антибиотикочувствительность штамма *E. mundtii* SCPM-O-B-8925**
Table 2. ***Antibiotic susceptibility of the strain E. mundtii SCPM-O-B-8925***

Антибиотик / *Antibiotic*	SCPM-O-B-8925 *E. mundtii*
Van	Чувствительный / *Sensitive*
Lz	Чувствительный / *Sensitive*
COT	Чувствительный / *Sensitive*
CD	Резистентный / *Resistant*
C	Чувствительный / *Sensitive*
P	Чувствительный / *Sensitive*
TEC	Чувствительный / *Sensitive*
LOM	Чувствительный / *Sensitive*
AH	Резистентный / *Resistant*
E	Резистентный / *Resistant*
S	Резистентный / *Resistant*
VI	Чувствительный / *Sensitive*
TE	Чувствительный / *Sensitive*
TOB	Резистентный / *Resistant*
AMP	Чувствительный / *Sensitive*
Гены антибиотикорезистентности / *Antibiotic resistance genes*	Не обнаружены / *Not found*

Ванкомицин (Van – 10 мкг/диск), хлорамфеникол (C – 30 мкг/диск), клиндамицин (CD – 10 мкг/диск), ко-тримоксазол (COT – 25 мкг/диск), линезолид (Lz – 10 мкг/диск), амикацин (AH – 30 мкг/диск), тейкопланин (TEC – 30 мкг/диск), эритромицин (E – 5 мкг/диск), ломефлоксацин (LOM – 10 мкг/диск), пенициллин G (P – 10 мкг/диск), вирджиниамицин (VI – 15 мкг/диск), стрептомицин (S – 10 мкг/диск), тетрациклин (TE – 30 мкг/диск), тобрамицин (TOB – 10 мкг/диск), ампициллин (AMP – 10 мкг/диск).
Vancomycin (Van – 10 μg/disc), chloramphenicol (C – 30 μg/disc), clindamycin (CD – 10 μg/disc), co-trimoxazole (SOT – 25 μg/disc), linezolid (Lz – 10 μg/disc), amikacin (AN – 30 μg/disc), teicoplanin (TES – 30 μg/disc), erythromycin (E – 5 μg/disc), lomefloxacin (LOM – 10 μg/disc), penicillin G (P – 10 μg/disc), virginiamycin (VI – 15 μg/disc), streptomycin (S – 10 μg/disc), tetracycline (TE – 30 μg/disc), tobramycin (TOV – 10 μg/disc), ampicillin (AMP – 10 μg/disc).

ветствующие гены резистентности в геноме обнаружены не были. Это свидетельствует об отсутствии приобретенных детерминант антибиотикоустойчивости и высоком профиле биологической безопасности штамма.

Несмотря на наличие фенотипической устойчивости к эритромицину и клиндамицину, в геноме штамма (на основе WGS-данных) не обнаружены известные детерминанты резистентности (гены семейства *erm*, *tet*, *van* и др.). Отсутствие мобильных генов резистентности к антибиотикам «резерва» (ванкомицину и линезолиду) при полной чувствительности к пенициллинам (пенициллин G, ампициллин) характеризует штамм SCPM-O-B-8925 как генетически стабильный и потенциально безопасный для дальнейшего использования.

Особого внимания заслуживает расхождение между фенотипической резистентностью штамма к макролидам (эритромицину) и аминогликозидам и результатами геномного профилирования. Проведенный биоинформатический анализ не выявил в геноме *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 известных детерминант активного выведения антибиотиков, в частности генов эффлюксных насосов (таких как системы семейств ABC, MFS или RND, ассоциированных с лекарственной устойчивостью) (рис. 1). Отсутствие генов эффлюксных систем при сохранении устойчивости к ряду препаратов может свидетельствовать либо об ограниченной проницаемости клеточной стенки данного штамма, либо о наличии новых, еще не описанных механизмов адаптации. С точки зрения биобезопасности, отсутствие мобильных генетических элементов (плазмид и транспозонов) с генами эффлюксных насосов и антибиотикорезистентности существенно снижает риск передачи факторов устойчивости к патогенным микроорганизмам, что характеризует штамм как генетически стабильный и безопасный (табл. 2).

При биоинформатическом анализе генома в базе данных CARD были выявлены последовательности с низким уровнем гомологии (32–35%) к гену *vanY* (кластер vanB) (рис. 1). Учитывая низкий процент идентичности и подтвержденную фенотипическую чувствительность штамма к ванкомицину и тейкопланину, данные последовательности были классифицированы как нативные D,D-карбоксипептидазы, не связанные с формированием антибиотикорезистентности.

Биобезопасность и метаболический профиль штамма

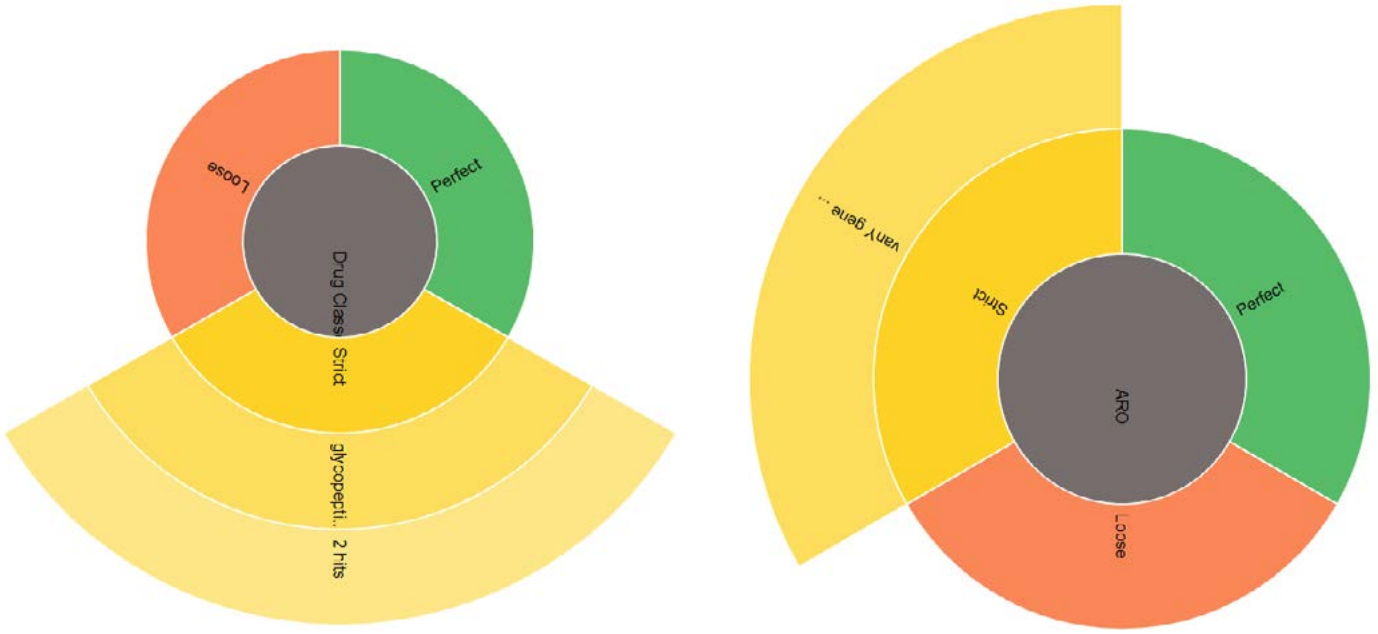
Генетический скрининг (*in silico*) не выявил в геноме *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 известных детерминант вирулентности энтерококков (таких как гены агрегационной субстанции *asa1*, желатиназы *gelE*, цитолизина *cyl*, поверхностного белка *esp* и др.). Это подтверждает низкий патогенный потенциал штамма и его безопасность для использования в биотехнологии. В исследуемом геноме не обнаружены последовательности профагов. Отсутствие интегрированных умеренных фагов свидетельствует о высокой генетической стабильности штамма и минимизирует риск горизонтального переноса нежелательных генов. Штамм характеризуется отсутствием способности к синтезу основных токсичных биогенных аминов (фенилентиламина, гистамина, кадаверина, путресцина и триптамина). Отсутствие соответствующих декарбоксилаз подтверждает метаболическую безопасность штамма. Эти же выводы подтвердились при фенотипическом определении способности к разжижению желатина (отсутствие желатиназы) и гемолизу на агаре с добавлением бараньей крови (отсутствие гемолизинов).

Совокупность данных по антибиотикочувствительности (чувствительность к ванкомицину и линезолиду), отсутствию факторов вирулентности, мобильных генетических элементов (профагов) и неспособности к продукции биогенных аминов позволяет классифицировать штамм *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 как безопасный (GRAS-статус).

2. Генетическая характеристика мундтицина P436

В предварительных исследованиях было установлено, что штамм *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 проявляет выраженную антимикробную активность в отношении тест-штамма *L. monocytogenes* ATCC 19111, а ПЦР-анализом подтверждено наличие генов мундтицина KS. После проведения полногеномного секвенирования это подтвердилось с использованием баз данных программ BAGEL4 и NCBI. На рис. 2 представлен локус мундтицина P436.

Анализ генетического окружения локуса мундтицина P436 (на рис. 2 обозначается как AOI_01, Mundticin KS cluster) представляет собой высокоорганизованный биосинтетический кластер, встроенный в активный метаболический и регуляторный контекст генома *E. mundtii*. Ядро биосинтетического кластера включает структурный ген (на



Описание / *Description*	Критерий сравнения / *Comparison criterion*	Индекс подобия, % / *Similarity Index, %*	Идентичность, % / *Identity, %*
Ген *vanY* в кластере vanB / *Gene vanY in cluster vanB*	Строгий / *Strict*	114,8	35,57
Ген vanY в кластере vanB / *Gene vanY in cluster vanB*	Строгий / *Strict*	102,4	32,17

Рис. 1. **Наличие генов антибиотикорезистентности, в т.ч. генов семейств эффлюксных насосов, в штамме SCPM-O-B-8925.** Зеленая зона – идентичность с референс-последовательностью 90–100%, желтая зона идентичность с референс-последовательностью 30–80%, красная зона – совпадений не обнаружено. Табличная часть рисунка – процент идентичности (правый столбец) указывает процент совпадения с референс-последовательностью. Индекс подобия – схожесть с консервативными частями референс-последовательностей.
Fig. 1. ***Presence of antibiotic resistance genes, including efflux pump family genes, in the strain SCPM-O-B-8925.***
The green zone indicates 90–100% identity with the reference sequence, the yellow zone indicates 30–80% identity with the reference sequence, and the red zone indicates no matches found. In the tabular part of the figure, the percentage of identity (right column) specifies the match percentage with the reference sequence. The similarity index represents similarity to conserved regions of the reference sequences.

рис. 2 *Mundticin_ATO6*), кодирующий препетид бактериоцина класса IIa. Наличие мотивов PF01721 (Pediocin-like) и PF10439 подтверждает его принадлежность к педиоциноподобным бактериоцинам с консервативным мотивом YGNGV. Ген иммунитета (*EntA-Immun*) содержит домен PF08951, обеспечивая специфическую защиту штамма-продуцента от действия собственного мундтицина. Процессинг и транспорт (*LanT*) аннотирован как лактококцин-G-процессирующий АТФ-связывающий белок (LagD) с доменами PF00005 (ABC-транспортер) и PF03412 (пептидаза семейства C39), что указывает на двойную функцию: отщепление лидерного пептида по двойному глицину (GG-motif) и одновременный экспорт зрелой молекулы из клетки.

Слева от кластера локализована фосфотрансферазная система (PTS): orf00001 и orf00003 – системы транспорта сорбитола/глюцитола; orf00005 – гликозил-гидролаза семейства 109. Локализация генов бактериоцина рядом с генами утилизации углеводов указывает на регуляторную связь: синтез мундтицина может активироваться в условиях конкуренции за специфические источники углерода в среде обитания.

Генетическая архитектура локуса мундтицина P436 штамма SCPM-O-B-8925 характеризуется наличием полного оперона мундтицина KS (*munA-munI-lanT*), окруженного генами PTS-систем утилизации сорбитола и мобильными генетическими элементами (инвертаза типа Tn552). Сочетание транспортных белков с доменами пептидаз семейства C39 и систем рестрикции I типа указывает на высокую автономность и функциональную зрелость данного кластера.

Нами обнаружены некоторые различия в структуре локуса мундтицина P436 от описанных классических мундтицинов. Классический локус Mundticin KS (штамм *E. mundtii* NFRI 7393) характеризуется компактной организацией из трех генов: структурного (*munA*), транспортного (*munB*) и гена иммунитета (*munC*) [7]. В отличие от классической модели, локус мундтицина P436 демонстрирует признаки горизонтального переноса и гибридной функциональности: вместо специализированного *munB* в нашем кластере присутствует *LanT* (семейство PF00005/PF03412), характерный для лактококцинов [29]. Ген защиты идентифицирован как *EntA-Immun* (PF08951), типичный для энтероцина CRL35 [30]. Наличие ДНК-инвертазы bin3 (orf00008) и систем рестрикции-модификации (orf00033) свидетельствует о локализации локуса на мобильном генетическом элементе.

Если Mundticin KS часто регулируется кворум-сенсингом, то наш локус функционально сопряжен с PTS-системой глюцитола/сорбитола (*srlE/srlA*). Наличие доменов EIIB и EIIC (orf00001, orf00003), гомологичных белкам *Clostridium beijerinckii*, предполагает, что экспрессия мундтицина P436 находится под жестким контролем углеродной катаболитной

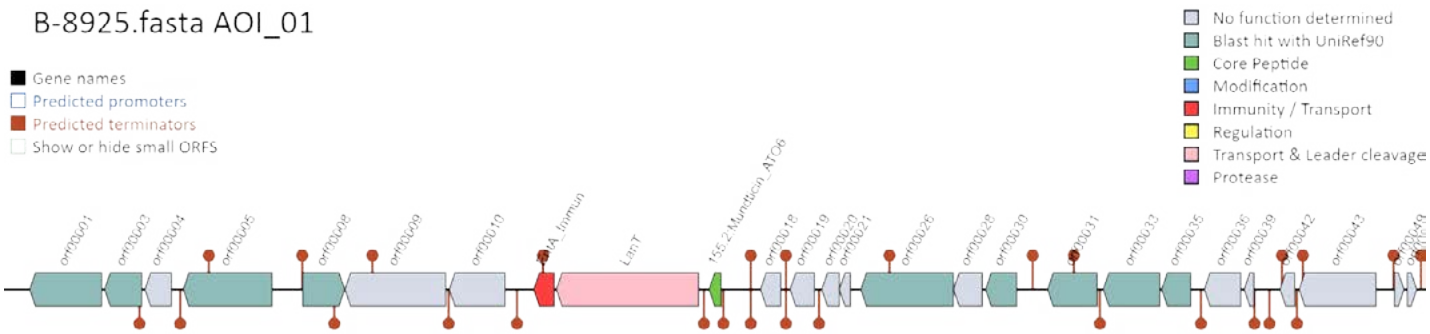


Рис. 2. **Генетическая организация локуса AOI_01 (кластер мундтицина P436) штамма *E. mundtii* SCPM-O-B-8925. Визуализация выполнена с помощью программы BAGEL4.**
Figure 2. ***Genetic organization of the AOI_01 locus (R436 mundticin cluster) in strain E. mundtii SCPM-O-B-8925. Visualization performed using the BAGEL4 program.***

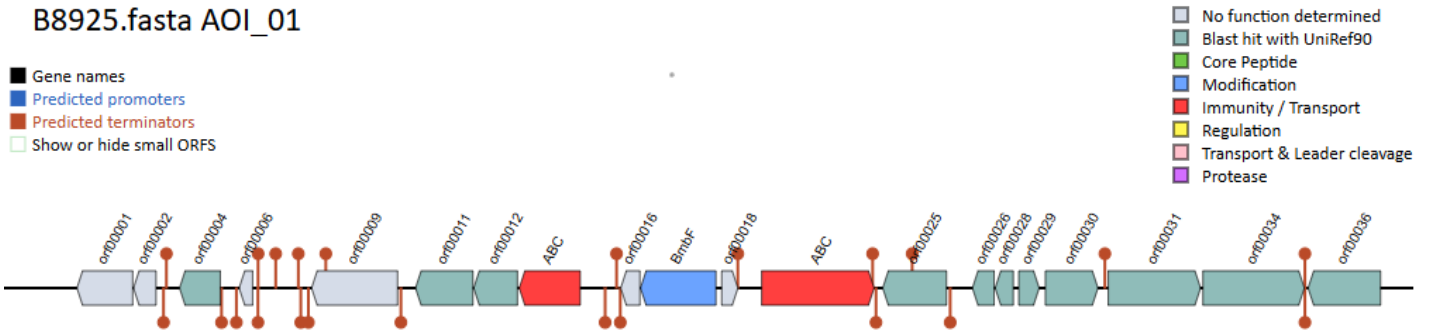


Рис. 3. **Анализ генетического локуса AOI_02. Визуализация выполнена с помощью программы BAGEL4.**
Figure 3. ***Analysis of the genetic locus AOI_02. Visualization performed using the software BAGEL4.***

репрессии (CCR). В присутствии глюкозы синтез будет подавлен, в то время как сорбитол (глюцитол) выступает в роли специфического индуктора [31].

Зрелый мундтицин P436 представляет собой классический мундтицин, состоящий из 43 а.о. – KYYGNGVSCNKKGC SVDWGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWKS, содержащий консервативный мотив KYYGNGV и дисульфидный мостик (между C в позициях 8 и 15 зрелого пептида), отвечающие за антимикробную активность бактериоцина, и в этом отношении не отличается от известных мундтицинов.

Помимо локуса мундтицина P436, при анализе генома был обнаружен еще один интересный локус, содержащий мотивы, которые позволили отнести его к семейству RiPPs – рибосомально синтезируемых пептидов. На рис. 3 представлена структура этого локуса.

Идентификация генетического локуса AOI_02 в геноме *E. mundtii* B-8925 свидетельствует о наличии системы биосинтеза микофактоцина – редкого представителя рибосомально синтезируемых и посттрансляционно модифицированных пептидов (RiPPs). Центральным звеном этого кластера является структурный ген прекурсора длиной 105 п.н. (34 а.о. – MKIVESKISSNRSNLMGCCLFFREGETDLFYSRF), обнаруженный при детальном ручном анализе слева от матуразы BmbF, содержащий консервативный дицистеиновый мотив (CC). Согласно современным моделям биогенеза микофактоцина, именно этот мотив служит специфической мишенью для радикальной SAM-матуразы MftC (в нашем случае – гомолога BmbF), которая катализирует образование углерод-углеродной связи между боковыми цепями тирозина и цистеина [32].

Наличие в непосредственной близости генов, кодирующих ABC-транспортеры, подтверждает функциональную завершенность локуса. В системах синтеза бактериоцинов и родственных RiPPs данные белки выполняют двойную роль: обеспечивают экспорт зрелого продукта из клетки и формируют механизм самоиммунитета [33]. Тот факт, что полная генетическая система микофактоцина обнаружена у штамма *E. mundtii*, расширяет наши представления о распространении этого кофактора. Традиционно микофактоцин ассоциировался с метаболизмом микобактерий [34]. Обнаружение аналогичной системы у энтерококков может указывать на важную роль этого редокс-активного соединения в адаптации *E. mundtii* к специфическим нишам или его участии в межвидовой конкуренции.

Таким образом, в ходе проведенного исследования детально охарактеризован штамм *E. mundtii* SCPM-O-B-8925, выделенный из респираторного тракта сельскохозяйственной птицы. Комплексный подход, сочетающий классическую микробиологию, масс-спектрометрию и полногеномное секвенирование, позволил установить следующее.

1. Таксономический статус и геномные характеристики. Полифазная идентификация однозначно подтвердила принадлежность штамма к виду *E. mundtii*. Сборка генома (NCBI ID: JAIZFT) размером 3,17 Мб с покрытием 137,7× послужила надежной базой для биоинформатического анализа.

2. Биологическая безопасность. Штамм характеризуется высоким профилем безопасности (статус GRAS). Чувствительность к антибиотикам резерва подтверждена отсутствием соответствующих генов резистентности.

Установлено отсутствие генов патогенности, профагов и систем синтеза токсичных биогенных аминов.

3. Антимикробный потенциал. В геноме идентифицирован полнофункциональный оперон мундтицина KS (munA-munI-lanT), кодирующий высокоактивный пептид класса IIa, эффективный против грамположительных патогенов (в частности, *Listeria* spp.).

4. Метаболическая уникальность. Обнаружен редкий для энтерококков биосинтетический кластер микофактоцина (RiPPs-кофактора) с участием радикальной SAM-матуразы (BmbF) и специфического пре-пептида (34 а.о.).

Доказанная биологическая биобезопасность штамма *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 с наличием активного локуса, кодирующего бактериоцин, позволяет рекомендовать его в качестве штамма-продуцента мундтицина P436 для использования в качестве биоконсерванта в пищевой промышленности. Кроме того, штамм является перспективным для использования в качестве постбиотика.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Funding

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Rospotrebnadzor.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература / References

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
2. 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
3. Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiol Mol Biol Rev. 2006 Jun;70(2):564-82. DOI: 10.1128/MMBR.00016-05
4. Feng G, Guron GK, Churey JJ, Worobo RW. Characterization of mundticin L, a class IIa anti-*Listeria* bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. Appl Environ Microbiol. 2009 Sep;75(17):5708-13. DOI: 10.1128/AEM.00752-09
5. Ferreira AE, Canal N, Morales D, Fuentefria DB, Corrêo G. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. Braz Arch Biol Technol. 2007;50(2):249-258.
6. Minahk CJ, Farías ME, Sesma F, Morero RD. Effect of enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane. FEMS Microbiol Lett. 2000 Nov 1;192(1):79-83. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09362.x
7. Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, et al. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. Appl Environ Microbiol. 2002 Aug;68(8):3830-40. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3830-3840.2002
8. Quadri LE, Yan LZ, Stiles ME, Vederas JC. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. J Biol Chem. 1997;272:3384-3388. DOI: 10.1074/jbc.272.6.3384.
9. Miller KW, Schamber R, Osmanagaoglu O, Ray B. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. Appl Environ Microbiol. 1998 Jun;64(6):1997-2005. DOI: 10.1128/AEM.64.6.1997-2005.1998
10. Abaimova A, Kartsev N, Svetoch E, Tazina O, Novikova T, Platonov M, et al. Mundticin KS: Characterization and production method. J Appl Environ Microbiol. 2021;9(1):9-21. DOI: 10.12691/jaem-9-1-3
11. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. EFSA J. 2017 Mar 14;15(3):e04664. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4664
12. Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol. 2008;126:291-301. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017
13. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect Control Hosp Epidemiol. 2016 Nov;37(11):1288-1301. DOI: 10.1017/ice.2016.174
14. Megran DW. Enterococcal endocarditis. Clin Infect Dis. 1992;15(1):63-71. DOI: 10.1093/clinids/15.1.63
15. Светоч ЭА, Теймуразов МГ, Тазина ОИ, Абаимова АА, Лев АИ, Асташкин ЕИ, и др. Антибиотикорезистентность культур *Enterococcus* spp., выделенных от промышленной птицы в 2013–2016 гг. в хозяйствах Российской Федерации, и детекция у них генов резистентности к ванкомицину. Альманах клинической медицины. 2017;45(2):138-146. / Svetoch EA, Teymurazov MG, Tazina OI, Abaimova AA, Lev AI, Astashkin EI, et al. Antibacterial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry of the Russian Federation farms in 2013–2016, and identification of vancomycin resistance genes. Almanac of Clinical

Medicine. 2017;45(2):138-146. DOI: 10.18786/2072-0505-2017-45-2-138-146. (In Russian).
16. Laulund S, Wind A, Derkx P, Zuliani V. Regulatory and safety requirements for food cultures. Microorganisms. 2017;5(2):28. DOI: 10.3390/microorganisms5020028
17. Fox A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present, and future. J Clin Microbiol. 2006;44(8):2677-2680. DOI: 10.1128/JCM.00971-06
18. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021
19. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res. 2016 Aug 19;44(14):6614-24. DOI: 10.1093/nar/gkw569
20. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, Smith KW, Raphenya AR, Wlodarski MA, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Nucleic Acids Res. 2023 Jan 6;51(D1):D690-D699. DOI: 10.1093/nar/gkac920
21. Center for Genomic Epidemiology. VirulenceFinder 2.0. Available at: http://www.genomicepidemiology.org.
22. van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. Nucleic Acids Res. 2013 Jul;41(Web Server issue):W448-53. DOI: 10.1093/nar/gkt391
23. Song W, Sun HX, Zhang C, Cheng L, Peng Y, Deng Z, et al. Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. Nucleic Acids Res. 2019 Jul 2;47(W1):W74-W80. DOI: 10.1093/nar/gkz380
24. MacFaddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
25. Bover-Cid S, Holzapfel WH. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 1999 Dec 1;53(1):33-41. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00152-x
26. Marcobal A, de las Rivas B, Moreno-Arribas MV, Muñoz R. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. J Food Prot. 2005 Apr;68(4):874-8. DOI: 10.4315/0362-028x-68.4.874
27. Coton E, Coton M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. J Microbiol Methods. 2005 Dec;63(3):296-304. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.04.001
28. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun. 2018 Nov 30;9(1):5114. DOI: 10.1038/s41467-018-07641-9
29. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg, JR. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, eds. Bacteriocins: Ecology and Evolution. Springer; 2007;45-92.
30. Tymoszewska A, Diep DB, Wirtek P, Aleksandrzak-Piekarczyk T. The Non-Lantibiotic Bacteriocin Garvicin Q Targets Man-PTS in a Broad Spectrum of Sensitive Bacterial Genera. Sci Rep. 2017 Aug 21;7(1):8359. DOI: 10.1038/s41598-017-09102-7
31. Zúñiga M, Comas I, Linaje R, Monedero V, Yebra MJ, Esteban CD, et al. Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters. Mol Biol Evol. 2005 Aug;22(8):1673-85. DOI: 10.1093/molbev/msi163
32. Haft DH, Basu MK. Biological systems discovery *in silico*: radical S-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. J Bacteriol. 2011 Jun;193(11):2745-55. DOI: 10.1128/JB.00040-11
33. Ayikpoe RS, Latham JA. MftD Catalyzes the Formation of a Biologically Active Redox Center in the Biosynthesis of the Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Redox Cofactor Mycofactocin. J Am Chem Soc. 2019 Aug 28;141(34):13582-13591. DOI: 10.1021/jacs.9b06102
34. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat Prod Rep. 2013 Jan;30(1):108-60. DOI: 10.1039/c2np20085f

Информация о соавторах:

Абаимова Алёна Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-2280-5793

Коваленко Илья Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Тазина Ольга Ивановна, лаборант-исследователь 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
ORCID: 0000-0001-8389-2494

Information about co-authors:

Alyona A. Abaimova, Junior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-2280-5793

Ilya M. Kovalenko, Junior Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Olga I. Tazina, Research Laboratory Technician of the Laboratory of Antimicrobial Drugs, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Angelina A. Kislichkina, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher of the Culture Collections Dep., State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-8389-2494