

УДК 579.222.3:579.264

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ФЕНОМЕНА ПРОДУКЦИИ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ АНТАГОНИЗМА СРЕДИ КОАГУЛАЗОНЕГАТИВНЫХ СТАФИЛОКОККОВ

© 2024 г. Т. В. Полюдова^{a, b, *}, Л. М. Лемкина^a, М. В. Антипьева^{a, b},
А. Л. Есаев^a, В. П. Коробов^a

^aИнститут экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614581, Россия

^bПермский государственный аграрно-технологический университет, Пермь, 614990, Россия

*e-mail: polyudova@iegm.ru

Поступила в редакцию 16.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 27.06.2024 г.

Проведен скрининг коагулазонегативных стафилококков (КНС), выделенных с объектов окружающей среды клинических стационаров, на способность к продукции антибактериальных соединений. Показано, что штаммы КНС с выраженной антагонистической активностью выявляются с частотой около 1.4%. Антибактериальная активность отдельных штаммов КНС обусловлена выделением в окружающую среду низкомолекулярных пептидных соединений. Молекулярная масса трех выделенных пептидов составляла 2985, 2998 и 3004 Да. Выделяемый бактериями *Staphylococcus hominis* пептид содержит в своем составе необычную аминокислоту метиллантионин и может быть отнесен к бактериоцинам класса I — лантибиотикам. Антибактериальная активность выделенных пептидов проявляется в отношении грамположительных бактерий различных родов, филогенетически не родственных продуцентам.

Ключевые слова: антибактериальная активность, пептидные бактериоцины, коагулазонегативные стафилококки, лантибиотики, нозокомиальные стафилококки

DOI: 10.31857/S0026365624060109

В настоящее время во всем мире наблюдается повышенный интерес исследователей к бактериям-оппортунистам, которые являются нормальными обитателями тела здорового человека. Это вызвано не только стабильно высокой их ролью в развитии некоторых инфекционных процессов (Patil et al., 2024), но и необходимостью в понимании значения бактерий-симбионтов кожи в поддержании ее гомеостаза. Таковыми являются и коагулазонегативные стафилококки (КНС), которые доминируют среди микрофлоры госпитальных пространств, обладают повышенной антибиотикоустойчивостью и часто являются причиной нозокомиальных инфекций, возникающих у людей во время или после пребывания в стационаре (Pinheiro-Hubinger et al., 2021). Все чаще комменсальные стафилококки признаются полезными для здоровья кожи. Например, показано, что они модулируют иммунную защиту слизистых оболочек и могут напрямую воздействовать на патогенную микрофлору, т.е. выполняют пробиотические функции (Severn

et al., 2022). Будучи постоянными спутниками человека, КНС мигрируют вместе со своим хозяином, оставляющим “микробный след” в местах своего пребывания. Наибольшее разнообразие и постоянное присутствие стафилококков регистрируется в лечебных учреждениях, где нозокомиальные штаммы КНС проходят жесткий отбор под давлением антибиотиков и антисептиков. Существуют также и другие селективные факторы, способствующие успешному внутрибольничному и межбольничному распространению бактерий, — например, факторы адгезии и формирования биопленок, обуславливающие колонизацию биоматериалов, имплантов, катетеров и прочих абиотических поверхностей (Wojtyczka et al., 2014).

Одним из свойств, способствующих колонизации различных экологических ниш, является проявление антагонистической активности бактерий, обусловленной выделением в окружающую среду соединений, ингибирующих рост ближайшего микробного окружения. Коагулазонегативные стафилококки

с выраженной антагонистической активностью по отношению к бактериям-конкурентам обнаружены среди изолятов, выделенных от диких и домашних животных (Nascimento et al., 2005; Braem et al., 2014), из различных очагов инфекций человека (Kassem et al., 2021), а также из пищевых продуктов (Fernandez-Fernandez et al., 2022). Однако степень антагонистической активности стафилококков, заселяющих госпитальные пространства, до сих пор не проанализирована. Развитие в полимикробной среде бактерий с высокой антагонистической активностью может способствовать их распространению и доминированию за счет эффективного подавления ближайшего конкурентного окружения. Одним из инструментов этого процесса может являться секретируемая в окружающую среду низкомолекулярных катионных пептидов, обладающих, как правило, широким спектром ингибирующего действия (Bastos et al., 2009).

В настоящее время представляется, что бактериоциногенность у КНС является широко распространенным явлением. Бактериоцины стафилококков — это, в основном, пептиды, синтезируемые на рибосомах и обладающие высокой антимикробной активностью (Bastos et al., 2020). Экологический смысл феномена продукции факторов антагонизма может заключаться в преимуществе продуцента при заселении привлекательных ниш, поэтому они наиболее активны в отношении близкородственных продуцентов бактерий со схожими экологическими потребностями (Heilbronner et al., 2021).

Целью настоящей работы явилось изучение распространенности продукции низкомолекулярных антибактериальных соединений пептидной природы среди КНС, выделенных из госпитальных пространств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период с 2007 по 2020 годы было исследовано 11350 штаммов КНС, выделенных из смывов с поверхностей различных абиотических объектов медицинских стационаров г. Перми с использованием селективной питательной среды на основе маннит-солевого агара (Charman medium, European pharm., USP) с добавлением желточной эмульсии. Идентификацию КНС с высокой антагонистической активностью проводили с помощью набора STAPHYtest 24 (“Lachema”, Чехия), а также с определением коагулазы (DrySpotTM Staphytest plus, “Thermo Fisher Scientific”, США) и чувствительности к новобиоцину (диски, “Erba Lachema”, Чехия).

В качестве тест-бактерий были использованы высокочувствительные к антибактериальным

соединениям бактерии *Staphylococcus cohnii* ВКМ 3165. Спектр антибактериальной активности (АБА) выделенных пептидов изучали на бактериях *Arthrobacter globiformis* ВКМ 193, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Corynebacterium ammoniagenes* ИЭГМ 1862, *Enterococcus faecalis* NCMB 13280, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Lactococcus lactis* NCDO 763, *Micrococcus luteus* ИЭГМ 391, *Micrococcus roseus* ВТ 394, *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948, *Rhodococcus erythropolis* ИЭГМ 268, *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70, *Staphylococcus aureus* 209P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* NCIMB 1475. Бактерии выращивали до логарифмической фазы роста на жидкой среде Luria Broth (Atlas, 2000). Готовили суспензию, содержащую 10^6 КОЕ/мл, которую использовали для оценки чувствительности бактерий к антибактериальным пептидам.

Поиск продуцентов антибактериальных соединений среди изолятов КНС проводили при их выращивании в разработанной ранее богатой питательной среде, содержащей (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ — 7, $MgSO_4 \times 7H_2O$ — 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ — 2, цитрат Na — 0.5, казеиновые кислоты (“Difco”, США) — 10, дрожжевой экстракт (“Difco”, США) — 5 (Патент РФ. 2006. № 2274654). Культивирование проводилось при 37°C с аэрацией на орбитальном шейкере (160 об./мин) в течение 10–15 ч. Затем клетки осаждали, надосадочную жидкость стерилизовали фильтрованием (Millex-GV Filter, 0.22 мкм; “Merck”, Германия). Ультрафильтрацию культуральных жидкостей проводили с использованием центрифужных концентраторов с порогом отсека 10 кДа (“Amicon”, “Merck”, США).

Антибактериальную активность (АБА) в фильтрах сред роста определили методом диффузии в агарозу. С этой целью стерильную питательную среду Muller Hinton (МН) (“HiMedia”, Индия) с 0.8% агарозы (“Lachema”, Чехия), охлаждали до 42°C и инокулировали суспензией тест-бактерий *S. cohnii* ВКМ 3165 до конечного количества 10^6 КОЕ/мл, распределяли ровным слоем в 3 мм (15 мл инокулированной агарозной среды МН в чашке Петри диаметром 80 мм). На поверхность застывшей агарозной среды наносили по 5 мкл исследуемых фильтратов культуральных жидкостей КНС. Капли высушивали в асептических условиях. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 16–18 ч. Наличие АБА определяли по формированию зон подавления роста газона индикаторной культуры.

Количественный анализ АБА в культуральных жидкостях КНС и растворах выделенных пептидов проводили с помощью метода двукратных серийных разведений с использованием жидкой среды МН. За условную единицу активности (ЕА) культуральных жидкостей принимали обратную

величину максимального разведения. Также рассчитывали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) пептидов, при которой наблюдалось полное ингибирование роста тест-бактерий (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010).

Природу АБА устанавливали с помощью обработки ультрафильтратов культуральных жидкостей различными гидролазами (Коробов и соавт., 2010). Кратко, к ультрафильтратам, обладающим АБА, добавляли равный объем буферного раствора (0.1 М Трис-НСl; pH 7.4) и 35 Е/мл трипсина ("Serva", Германия) или 3 Е/мл протеиназы К ("Sigma", США). Для обработки ДНК-азой ("Sigma", США) к ультрафильтратам добавляли равный объем 0.2М Na-ацетатный буфера с pH 5.0 и фермент в количестве 36 Е/мл. Для обработки РНК-азой ("Reanal", Венгрия) добавляли равный объем 0.2М Трис-НСl буфера с pH 7.2 и фермент в количестве 20 Е/мл. Ультрафильтраты с ферментами инкубировали в течение 2 ч при 37°C, после чего определяли их антибактериальную активность методом двукратных разведений. Контрольные пробы инкубировали в соответствующих буферных растворах в тех же условиях.

Выделение антибактериальных соединений из культуральных жидкостей КНС проводили ионообменной хроматографией на колонке EC (25×500 мм, "BioRad", США) со смолой Тоуорепarl-SP 650М ("Toso", Япония), которую уравнивали 10 мМ Na-фосфатным буфером (Полюдова и соавт., 2017). Для антибактериальных пептидов *Staphylococcus hominis* значение pH буфера соответствовало 6.8, для пептидов *S. haemolyticus* и *S. warneri* — 7.2. Антибактериальные соединения элюировали линейным градиентом NaCl (0–0.5 М) в соответствующем фосфатном буфере. Фракции элюата с АБА объединяли и диализовали на мембранах "Spectrum Laboratories, Inc." (США). Обессоленные растворы пептидов высушивали на концентраторе Univapo 100 Н ("UniEquip", Германия).

Очистку пептидов до гомогенного состояния проводили с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе (АСТА purifier 10, Великобритания) с использованием колонки с диоксидом кремния в качестве неподвижной фазы и углеродными лигандами C2/C18 ("Amersham Bioscience", США). Последовательные этапы проводили с использованием различных видов градиента ацетонитрила (Коробов и соавт., 2010).

Масс-спектрометрический анализ пептидов, выделенных из культуральных жидкостей КНС, проводили на приборе Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation ("PerSeptive Biosystems", США). Аминокислотный состав пептида, выделенного из среды роста *S. hominis* определяли после его гидролиза в 6 М HCl в запаянных ампулах в атмосфере азота при 60°C. Затем гидролизат обрабатывали фенилизотиоцианатом, а производные

аминокислот разделяли обращенно-фазовым методом на колонке C18 с использованием Amino Acid Analyser 420A ("Applied Biosystems", США) в автоматическом режиме.

Все результаты, полученные не менее чем в трех независимых экспериментах и не менее чем в 3 повторностях, обрабатывали с помощью программы MS Excel 2007. В таблицах и на рисунках приведены средние значения с указанием доверительных интервалов ($\alpha = 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При выращивании бактерии на селективной питательной среде маннит-солевом агаре с желточной эмульсией отбирали колонии, не обладающие лецитиназной активностью, характерной для бактерий *S. aureus* (Дерябин, 2000). Отсутствие коагулазы подтверждали с помощью слайд-коагулазного теста для дифференциации коагулазо-положительных и коагулазонегативных стафилококков. В исследовании использовали только коагулазонегативные бактерии. За период проведения скрининга на способность к продукции антибактериальных соединений было исследовано 11350 изолятов КНС. Антагонистическая активность по отношению к тест-бактериям *S. cohnii* ВКМ-3165 была выявлена в культуральной жидкости 161 штамма КНС методом диффузии в агарозу (рис. 1). Через 10–15 ч роста

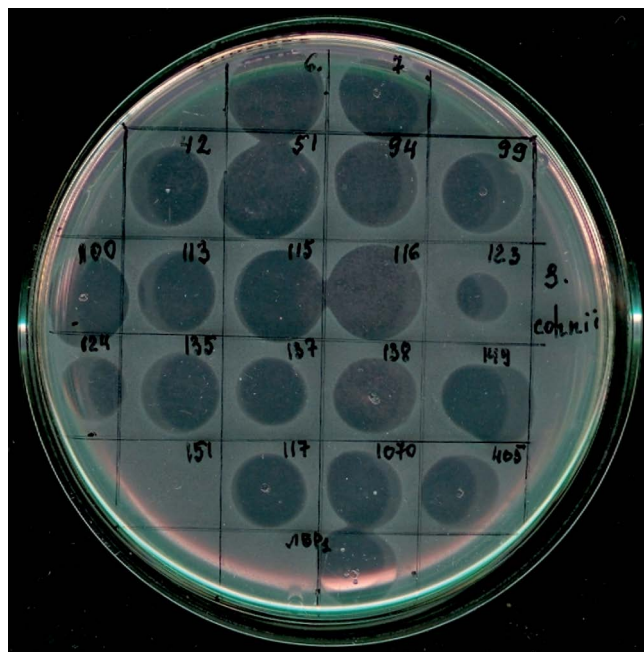


Рис. 1. Выявление АБА в бесклеточных культуральных жидкостях КНС методом диффузии в агарозу с использованием тест бактерий *S. cohnii* ВКМ-3165.

КНС на обогащенной питательной среде (Патент РФ № 2274654, 2006.) рН среды культивирования составлял 6.0 ± 0.5 . Данный уровень кислотности не оказывает ингибирующего действия на рост стафилококков в целом (Дерябин, 2000) и *S. cohnii* ВКМ-3165 в частности.

При регулярном скрининге ежегодно выявлялось от 0.27 до 3.0% штаммов бактерий, обладающих антагонистической активностью (табл. 1). Среди госпитальных штаммов КНС в среднем $1.42 \pm 0.118\%$ изолятов обладали способностью к продукции антибактериальных соединений.

Ультрафильтрацией бесклеточных культуральных жидкостей с выраженной АБА показано, что антибактериальными свойствами обладали фильтраты, полученные порогом отсека 10 кДа. Данный факт свидетельствует о низкой молекулярной массе соединений, обуславливающих антибактериальную активность.

Протеолитическая обработка была проведена для ультрафильтратов сред культивирования КНС, АБА которых на газоне индикаторной культуры была более 10 мм и более 256 ЕА, определенных методом двукратных разведений. Так, были исследованы ультрафильтраты 30 изолятов из 161 отобранных штаммов-продуцентов. Как показали исследования, АБА полностью исчезала после воздействия трипсина и протеиназы К. Обработка ультрафильтратов ДНКазой и РНКазой не оказывала влияния на их АБА. Полученные результаты позволили заключить, что АБА обусловлена низкомолекулярными соединениями пептидной природы.

Идентификацию стафилококков проводили с помощью STAPHYtest 24 и дополнительных тестов на коагулазу и чувствительность к ново-биоцину. Среди 30 продуцентов с АБА культуральных жидкостей более 256 ЕА было выявлено 12 штаммов вида *S. warneri*, 11 штаммов — *S. cohnii*, 5 штаммов — *S. haemolyticus* и по 1 штамму видов *S. epidermidis* и *S. hominis*. Бактерии вида *S. hominis* были депонированы в коллекцию Государственного института стандартизации качества (ГИСК) под номером 284, а пептид, продуцируемый этими бактериями, получил название хоминин (Патент РФ № 2528055).

Для проведения дальнейших исследований было выбрано 3 штамма бактерий с высоким уровнем устойчивой продукции антибактериальных соединений — *S. haemolyticus* 117, *S. hominis* 405 (ГИСК-284) и *S. warneri* 1535. Динамика периодического роста и продукции антибактериальных соединений были схожи в культурах всех трех штаммов КНС. Однако максимальный уровень АБА в среде роста существенно различался (рис. 2). Следует отметить, что на поздних стадиях роста наблюдалось снижение АБА в культуральных жидкостях, вероятно, связанное с действием протеолитических ферментов, высвобождающихся из отмирающих клеток.

Антибактериальные пептидные соединения бактерий *S. haemolyticus* 117, *S. hominis* ГИСК-284 и *S. warneri* 1535 были получены в очищенном виде методами ионообменной и высокоэффективной обратной фазовой хроматографий. Масс-спектрометрические характеристики полученных антибактериальных соединений свидетельствуют о том, что пептид бактерий

Таблица 1. Количество штаммов КНС, обладающих антагонистической активностью по отношению к тест-бактериям *S. cohnii* ВКМ-3165

Год	Общее количество исследованных штаммов КНС	Количество штаммов-антагонистов	% штаммов-антагонистов
2007	664	14	2.11
2008	1095	14	1.27
2009	573	5	0.87
2010	446	8	1.79
2011	1001	6	0.59
2012	1847	5	0.27
2013	842	15	1.78
2014	1430	18	1.25
2015	1632	47	2.87
2016	875	9	1.03
2017	327	10	3.05
2018	292	3	1.02
2019	207	4	1.93
2020	119	3	2.52
Итого	11350	161	1.42

S. haemolyticus 117 обладал молекулярной массой 3004 Да, пептид *S. hominis* ГИСК-284 – 2985 Да, а пептид *S. warneri* 1535 – 2844 Да (рис. 3).

Согласно имеющимся в литературе данным, значительная доля известных бактериоцинов стафилококков относится к группе лантибиотиков

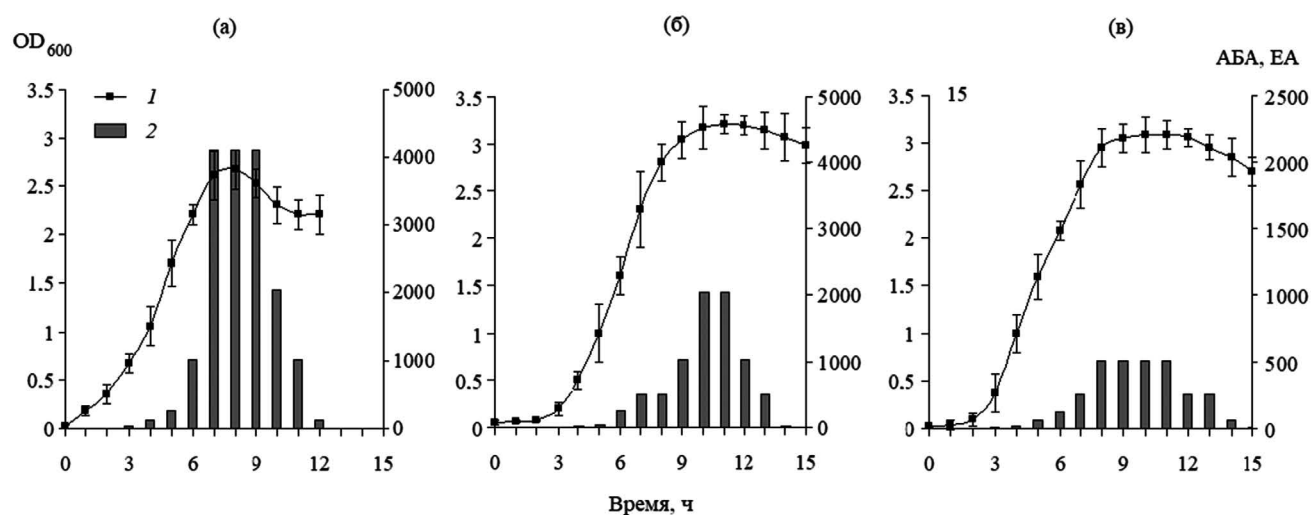


Рис. 2. Кривые роста (1) и антибактериальные активности культуральных жидкостей (2) *S. haemolyticus* 117 (а), *S. hominis* ГИСК-284 (б) и *S. warneri* 1535 (в).

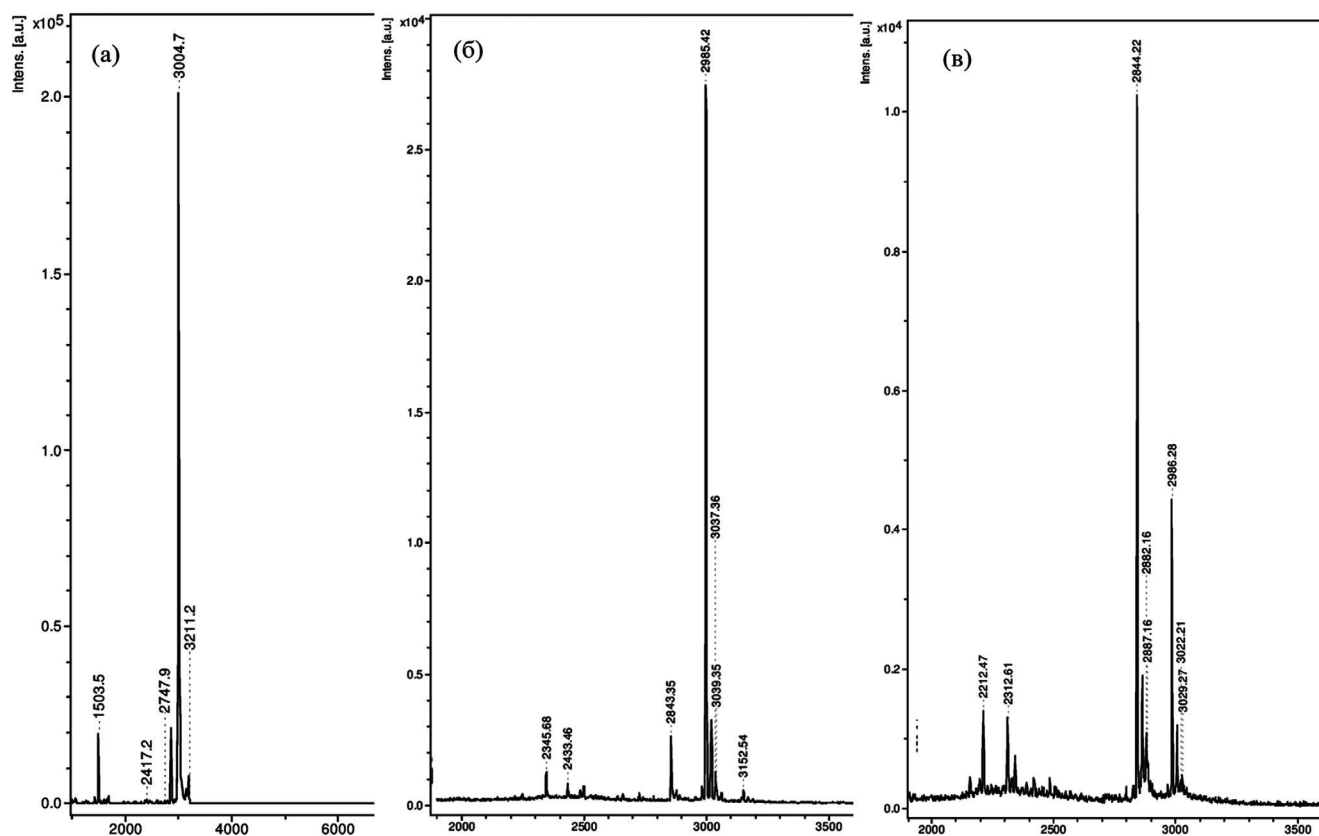


Рис. 3. Масс-спектры очищенных пептидов из культуральных жидкостей *S. haemolyticus* 117 (а), *S. hominis* ГИСК 284 (б) и *S. warneri* 1535 (в).

(варнерин, галлидермин, нукацин, эпидермин, эпиланцин, эпицидин, стафилококцин BacR1, Рер5) (Bierbaum et al., 1996; Коробов и соавт., 2010). Это пептиды, имеющие в своей структуре пост-трансляционно модифицированные аминокислоты, такие как дигидробутирин, дигидроаланин, лантионин или метиллантионин (Пипия и соавт., 2020). Реже встречаются бактериоцины класса II (ауреоцины А70 и 53) (Bastos et al., 2009). Анализ состава аминокислот в пептиде, продуцируемом *S. hominis* ГИСК 284, показал высокое содержание в нем остатков катионных аминокислот (аргинин,

лизин, гистидин) (табл. 2). Кроме того, обнаружен остаток посттрансляционно модифицированных аминокислот треонина и серина — метиллантионин, что позволяет отнести выделенный пептид к бактериоцинам класса I — лантибиотикам.

Практически все известные к настоящему времени бактериоцины КНС обладают широким спектром антимикробной активности, не только в отношении бактерий рода *Staphylococcus*, но и других условно патогенных и патогенных грамположительных бактерий, в том числе и антибиотикорезистентных форм (Cotter et al., 2013).

Таблица 2. Аминокислотный состав хоминина, продуцируемого бактериями *S. hominis* ГИСК 284

Аминокислота	Содержание (%)	Аминокислота	Содержание (%)
Аланин	6.2 ± 0.43	Лизин	35.1 ± 3.12
Аргинин	11.5 ± 1.08	Метионин	0.6 ± 0.28
Аспарагин	3.0 ± 0.24	Фенилаланин	0.8 ± 0.26
Цистеин	6.8 ± 0.74	Пролин	3.1 ± 0.39
Глицин	9.4 ± 0.78	Серин	3.3 ± 0.28
Гистидин	4.5 ± 0.61	Треонин	1.8 ± 0.55
Изолейцин	3.7 ± 0.19	Тирозин	0.8 ± 0.31
Метиллантионин	2.3 ± 0.34	Валин	3.2 ± 0.25
Лейцин	4.7 ± 0.23		

Таблица 3. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибактериальных пептидов, выделенных из сред роста *S. hominis* ГИСК-284 (хоминин), *S. haemolyticus* 117 (пептид 117) и *S. warneri* 1535 (пептид 1535)

Штамм	МИК, мкг/мл		
	Хоминин	Пептид 117	Пептид 1535
<i>A. globiformis</i> ВКМ 193	1.0	8	256
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	16	32	16
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 1862	1.0	256	0.5
<i>E. faecalis</i> NCMB 13280	1.0	—	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	—	—	—
<i>L. lactis</i> NCDO 763	32	4	4
<i>M. luteus</i> ИЭГМ 391	16	0.5	0.5
<i>M. roseus</i> ВТ 394	2.0	0.5	0.25
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	2.0	0.5	1.0
<i>P. fluorescens</i> ATCC 948	—	—	—
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ АС 268	16.0	16.0	8.0
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 70	32.0	16.0	16.0
<i>S. cohnii</i> ВКМ 3165	0.5	0.25	0.25
<i>S. aureus</i> 209 Р	16.0	64.0	64.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	32.0	64.0	0.25
<i>S. pyogenes</i> NCIMB 1475	1.0	—	—

Примечание. “—” — Бактерии не чувствительны к антибактериальному действию.

Исследование АБА выделенных пептидов на различных тест-бактериях показало, что все они проявляли активность лишь в отношении грамположительных бактерий. Грамотрицательные бактерии *E. coli* ATCC 25922 и *P. fluorescens* ATCC 948 были резистентны к действию выделенных пептидов (табл. 3).

Анализ полученных в настоящей работе и имеющихся в литературе данных позволяет рассматривать выделенные бактериоцины в качестве новых представителей антибактериальных низкомолекулярных пептидов, синтезируемых КНС.

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди стафилококков, выделенных с абиотических поверхностей объектов окружающей среды, способность к продукции подобных бактериоцинов субстанций встречается не чаще, чем в 1.5% случаев, как было показано ранее (Fernandez-Fernandez et al., 2022) и в настоящем исследовании. Стафилококки, выделенные от носителей, значительно чаще проявляют антагонистическую активность. Так, среди изолятов от диких животных выявляется до 6.2% штаммов-антагонистов (Fernández-Fernández et al., 2022). От домашних животных, по разным данным, выделяется от 6.5 до 30% бактериоцин-синтезирующих стафилококков (Braem et al., 2014; Rahmdel et al., 2019; Fernández-Fernández et al., 2022). Среди изолятов, полученных с разных участков тела здоровых людей, 3.7% являются бактериоциногенными (Fernandez-Fernandez et al., 2022). Стафилококки, выделенные из крови и кожных ран человека, являются продуцентами бактериоцинов в 20% случаев (Kassem et al., 2021). Антибиотики и другие пептидные бактериоцины, выделяемые КНС, обитающими на теле хозяина, действуют как противомикробные агенты и могут способствовать нормальной защите от нежелательной микрофлоры на границе эпидермиса (Gallo, Nakatsuji. 2011). Несмотря на то, что антимикробная активность является общей чертой бактериоцинов, эти вещества могут также играть и другие роли, проявляя многофункциональность. Например, выполнять регуляторные функции, способствующие бактериям заселять экологические ниши (Bastos et al., 2020). Понимание роли бактерий-симбионтов кожи в поддержании ее гомеостаза, является областью, требующей детального изучения, включая исследование метаболитов и продуктов ферментации основных представителей симбиотической микрофлоры.

Среди бактерий видов *S. hominis*, *S. haemolyticus* и *S. warneri* известны продуценты подобных соединений. Так, хомининин, синтезируемый бактериями штамма *S. hominis* MBBL2-9, является термостабильным пептидом с молекулярной массой 2038.4

Да и обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении близкородственных продуцентов бактерий, в том числе и их антибиотикорезистентных форм (Kim et al., 2010). В литературе приводятся сведения относительно низкомолекулярного антибактериального катионного пептида нукацина, синтезируемого бактериями *S. hominis* KQU-131, имеющего молекулярную массу 3003.97 Да и содержащего в составе молекулы катионные и гидрофобные аминокислотные остатки, а также лантионин. Нукацин KQU-131 активен в отношении некоторых грамположительных бактерий (Wilaipun et al., 2008). Представленный в настоящей работе пептид хоминин является катионным соединением с молекулярной массой 2985 Да, имеющим в составе молекулы значительную долю катионных аминокислот (51.1%) (табл. 2), определяющих выраженный положительный заряд молекулы. Большинство известных лантибиотиков являются катионными пептидами и имеют положительный заряд от +2 до +9. Важность суммарного положительного заряда антибактериальных пептидов заключается во взаимодействии, связывании и дестабилизации мембран бактерий-мишеней (Suda et al., 2010). Согласно данным масс-спектропии, хоминин является новым представителем семейства лантибиотиков, близким по молекулярной массе к пептиду эрицину А (Bierbaum, Sahl. 2009). Однако эрицин А, в отличие от хоминина, продуцируют бактерии *Bacillus subtilis* A1/3. В составе молекулы эрицина обнаружено 5 остатков лантионина, а спектр его антибактериальной активности существенно уже, чем у хоминина (Stein et al., 2002). Среди бактерий *S. haemolyticus* недавно обнаружен продуцент нового бактериоцина, получившего название ромсацин, который представляет собой двупептидный лантибиотик с молекулярными массами пептидов 3149.97 и 3548.16 Да. Ромсацин обладает широким спектром АБА в отношении грамположительных бактерий (Wolden et al., 2023). Широко известны продуценты лантибиотиков и среди бактерий вида *S. warneri*. Антибиотик варнеринин RB4 обнаружен у бактерий *S. warneri* RB4 (Minamikawa et al., 2005), а нукацин ISK является продуктом синтеза *S. warneri* ISK-1 (Sashihara et al., 2000). Варнерин, также являющийся лантибиотиком, выделен из сред роста *S. warneri* DSMZ 16081 (Petersen et al., 2009; Коробов и соавт., 2010). Пептидные продукты метаболизма бактерий *S. warneri* TRPF4 проявляли выраженную антибактериальную активность против *Legionella pneumophila* (Freitas et al., 2020). Анализ литературы показал, что практически все бактериоцин-подобные соединения КНС являются представителями бактериоцинов класса I.

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить частоту распространения среди КНС штаммов с выраженной антагонистической

активностью, обусловленной продукцией бактериоцинподобных субстанций. Анализ накопленного материала указывает на то, что феномен распространности продукции антибактериальных пептидов среди изученных клинических штаммов КНС, выделенных с абиотических поверхностей, составляет не более 1.5%. Стафилококки способны к адаптации и длительной персистенции в широком диапазоне сред даже в условиях, ограничивающих их рост (Onyango, Alreshidi, 2018). Тем не менее типичной средой обитания этих бактерий являются кожные покровы теплокровных животных и человека (Joglekar et al., 2023). Полученные данные и анализ научной литературы свидетельствуют о том, что продукция бактериоцинов стафилококками, выделенными из ниш, не характерных для экологии этих бактерий, является редко наблюдаемым явлением.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: государственное задание “Биоразнообразие микроорганизмов антропогенно загрязненных экосистем и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям окружающей среды”, регистрационный номер 124020500028-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных и людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. 240 с.
- Коробов В.П., Лемкина Л.М., Полюдова Т.В., Акименко В.К. Выделение и характеристика нового низкомолекулярного антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 228–238.
- Korobov V.P., Lemkina L.M., Polyudova T.V., Akimenko V.K. Isolation and characterization of new low-molecular antibacterial peptide of the lantibiotics family // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 206–215.
- Пипия С.О., Терехов С.С., Мокрушина Ю.А., Кнорре В.Д., Смирнов И.В., Габиров А.Г. Использование расширенного химического пространства лантибиотиков для создания искусственного биоразнообразия генетически кодируемых антибиотиков // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 1550–1568.
- Pipiya S.O., Terekhov S.S., Mokrushina Y.A., Knorre V.D., Smirnov I.V., Gabibov A.G. Engineering artificial biodiversity of lantibiotics to expand chemical space of DNA-encoded antibiotics // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 1319–1334.
- Патент РФ. 2006. № 2274654.
- Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. С. 47–54.
- Polyudova T.V., Lemkina L.M., Korobov V.P., Likhat-skaya G.N. Optimization of production conditions and 3D-structure of novel antibacterial peptide of lantibiotic family // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 40–46.
- Патент РФ. 2014. № 2528055.
- Atlas R.M. Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 1993. 1079 p.
- Bastos M., Ceotto H., Coelho M.L.V., Nascimento J.S. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. V. 10. P. 38–61.
- Bastos M., de Farias M., Fagundes C., Coelho M. Staphylococci: an update on antimicrobial peptides produced by staphylococci and their diverse potential applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 104. P. 10339–10368.
- Bierbaum G., Sahl H. Lantibiotics: mode of action and bioengineering // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. V. 10. P. 2–18.
- Bierbaum G., Götz F., Peschel A., Kupke T., van de Kamp M., Sahl H.G. The biosynthesis of the lantibiotics epidermin, gallidermin, Pep5 and epilancin K7 // Antonie van Leeuwenhoek. 1996. V. 69. P. 119–127.
- Braem G., Stijlemans B., Van Haken W., de Vlieghe S., de Vuyst L., Leroy F. Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens // J. Appl. Microbiol. 2014. V. 116. P. 1084–1093.
- Cotter P., Ross R., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. 2013. P. 95–105.
- Fernández-Fernández R., Lozano C., Eguizábal P., Ruiz-Ripa L., Martínez-Álvarez S., Abdullahi I.N., Zarazaga M.,

- Torres C. Bacteriocin-like inhibitory substances in *Staphylococci* of different origins and species with activity against relevant pathogens // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Art. 870510.
- Freitas F.S., Vidigal P.M.P., Siqueira T.P., de Barros M., Totola M.R. The draft genome of *Staphylococcus warneri* TRPF4, a bacteriocin producer with potent activity against the causative agent of Legionnaires' Disease // *3 Biotech.* 2020. V. 10. Art. 232.
- Gallo R.L., Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin // *J. Invest Dermatol.* 2011. V. 131. P. 1974–1980.
- Heilbronner S., Krismer B., Brötz-Oesterhelt H., Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 726–739.
- Joglekar P., Conlan S., Lee-Lin S.Q., Deming C., Kashaf S.S., Kong H.H., Segre J.A. Integrated genomic and functional analyses of human skin-associated *Staphylococcus* reveal extensive inter- and intra-species diversity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023. V. 120. Art. e2310585120.
- Kassem M., Saafan A., Bayomy F., El-Gendy A. Exploring clinically isolated *Staphylococcus* sp. bacteriocins revealed the production of amonabactin, micrococcin, and α -circulocin // *Iranian J. Microbiol.* 2021. V. 13. P. 212–224.
- Kim P., Sohng J., Sung C., Joo H., Kim E., Yamaguchi T., Park D., Kim B. Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, hominisin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2–9 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 399. P. 133–138.
- Minamikawa M., Kawai Y., Inoue N., Yamazaki K. Purification and characterization of Warnericin RB4, anti-*Al-icyclobacillus* bacteriocin, produced by *Staphylococcus warneri* RB4 // *Curr. Microbiol.* 2005. V. 51. P. 22–26.
- Nascimento J., Fagundes P., Brito M., Santos K., Bastos M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis // *Veter. Microbiol.* 2005. V. 106. P. 61–71.
- Onyango L.A., Alreshidi M.M. Adaptive metabolism in staphylococci: survival and persistence in environmental and clinical settings // *J. Pathog.* 2018. V. 2018. Art. 1092632.
- Patil G., Agarwala P., Das P., Pathak S. Rise in the pathogenic status of coagulase-negative staphylococci causing bloodstream infection // *Cureus.* 2024. V. 16. Art. e57250.
- Petersen J., Boysen A., Fogh L., Tabermann K., Kofoed T., King A., Schrotz-King P., Hansen M.C. Identification and characterization of a bioactive lantibiotic produced by *Staphylococcus warneri* // *Biol. Chem.* 2009. V. 390. P. 437–444.
- Pinheiro-Hubinger L., Moraes Riboli D., Abraao L., Pereira Franchi E., Ribeiro de Souza da Cunha M. Coagulase-negative staphylococci clones are widely distributed in the hospital and community // *Pathogens.* 2021. V. 10. Art. 792.
- Rahmdel S., Shekarforoush S., Hosseinzadeh S., Torriani S., Gatto V. Antimicrobial spectrum activity of bacteriocinogenic *Staphylococcus* strains isolated from goat and sheep milk // *J. Dairy Sci.* 2019. V. 102. P. 2928–2940.
- Sashihara T., Kimura H., Higuchi T., Adachi A., Matsusaki H., Sonomoto K., Ishizaki A. A novel lantibiotic, nukacin ISK-1, of *Staphylococcus warneri* ISK-1: cloning of the structural gene and identification of the structure // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. P. 2420–2428.
- Severn M., Williams M., Shahbandi A., Bunch Z., Lyon L., Nguyen A., Zaramela L., Todd D., Zengler K., Cech N., Gallo R., Horswill A. The ubiquitous human skin commensal *Staphylococcus hominis* protects against opportunistic pathogens // *mBio.* 2022. V. 13. P. 930–952.
- Stein T., Borchert S., Conrad B., Feesche J., Hofemeister B., Hofemeister J., Entian K. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3 // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1703–1711.
- Suda S., Hill C., Cotter P.D., Ross R.P. Investigating the importance of charged residues in lantibiotics // *Bioeng. Bugs.* 2010. V. 1. P. 345–351.
- Wilaipun P., Zendo T., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. Identification of the nukacin KQU-131, a new type-A(II) lantibiotic produced by *Staphylococcus hominis* KQU-131 isolated from Thai fermented fish product (Pla-ra) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. V. 72. P. 2232–2235.
- Wojtyczka R., Orlewska K., Kępa M., Idzik D., Dziedzic A., Mularz T., Krawczyk M., Mikłasińska M., Wąsik T. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment // *Int. J. Environ. Res. Publ. Health.* 2014. V. 11. P. 4619–4633.
- Wolden R., Ovchinnikov K.V., Venter H.J., Oftedal T.F., Diep D.B., Cavanagh J.P. The novel bacteriocin romsacin from *Staphylococcus haemolyticus* inhibits Gram-positive WHO priority pathogens // *Microbiol. Spectrum.* 2023. V. 11. P. 869–892.

Prevalence of the Phenomenon of Production of Peptide Factors of Antagonism Among Coagulase-Negative Staphylococci

T. V. Polyudova^{1, 2, *}, L. M. Lemkina¹, M. V. Antipyeva^{1, 2}, A. L. Yesaev¹, V. P. Korobov¹

¹*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614581, Russia*

²*Perm State Agrarian and Technological University, Perm, 614990, Russia*

**e-mail: polyudova@iegm.ru*

Coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from clinical hospital environmental objects were screened for their ability to produce antibacterial compounds. It was shown that CNS strains with pronounced antagonistic activity were detected with a frequency of about 1.4%. The antibacterial activity of individual CNS strains was due to the release of low-molecular peptide compounds into the environment. The molecular weight of three isolated peptides was 2985, 2998, and 3004 Da. The peptide secreted by *Staphylococcus hominis* bacteria contains an unusual amino acid, methyllanthionine, and can be classified as a class I bacteriocin, a lantibiotic. The antibacterial activity of the isolated peptides was demonstrated against gram-positive bacteria of various genera that are phylogenetically unrelated to the producers.

Keywords: antibacterial activity, peptide bacteriocins, coagulase-negative staphylococci, lantibiotics, nosocomial staphylococci