
КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИОЦИНА СУБТИЛОЗИНА П19 НА СПОРЫ *Bacillus anthracis*

© 2023 г. В. Д. Похиленко^а, *, В. Н. Герасимов^а, С. К. Жиглецова^а, Т. А. Калмантаев^а,
И. А. Чукина^а, Р. И. Миронова^а, А. Р. Гайтрафимова^а

^а Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора,
Оболensk, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Поступила в редакцию 15.03.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Впервые показано повреждающее действие бактериоцина на интактные споры *Bacillus anthracis* с применением метода трансмиссионной электронной микроскопии. Выделенный из штамма *Bacillus subtilis* П19 новый бактериоцин — субтилозин П19 эффективно разрушал интактные споры *B. anthracis* в концентрациях 0.5–35 мкг/мл за 60 мин совместной инкубации. Совокупность полученных данных, в сочетании с анализом известных механизмов действия бактериоцинов, позволяют предположить, что в основе механизма инактивации спор, по-видимому, лежит множественное нарушение целостности внутренней и наружной мембран, окружающих кортекс покоящейся споры. Вероятно, также, что конфигурация молекулы субтилозина П19 позволяет ему проникать через внешние покровы и повреждать жизненно важные мембранные структуры кортекса спор. Субтилозин П19 может служить перспективной основой новых антимикробных препаратов природного происхождения.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, споры, бактериоцин, субтилозин П19, трансмиссионная электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0026365623600098, **EDN:** CYPVHR

Сибирская язва — смертельная болезнь млекопитающих, была и остается постоянной глобальной проблемой (Pilo, Frey, 2018; Онищенко и соавт., 2018). Вспышки этой болезни продолжают происходить по всему миру, и, даже при наличии вакцины, сибирская язва по-прежнему представляет собой серьезную опасность для людей и животных. Основной инфекционной формой *B. anthracis*, вызывающей сибирскую язву, являются споры. Структура и состав бактериальных спор обуславливают их высокую устойчивость к различного рода воздействиям (Nicholson et al., 2000). Традиционно споры инактивируют методом автоклавирования, позволяющим за счет повышенного давления пара достигать температуры в 120°C и выше, а также их обработкой высоко агрессивными химическими реагентами (Wood, Adrion, 2019). В качестве безопасной и эффективной альтернативы существующим технологиям обработки против бактериальных спор в течение последних нескольких десятилетий интенсивно исследовались бактериоцины — антимикробные пептиды (Egan et al., 2016; Romero-Rodríguez et al., 2023). Было

установлено, что два бактериоцина — низин и га-лодурацин активны в отношении прорастающих спор и не действуют на покоящиеся споры *B. anthracis* (Gut et al., 2011; Oman, van der Donk, 2009).

Ранее нами был выделен из растительного сырья страстоцвета (*Passiflora edulis*) штамм *Bacillus subtilis* П19 № В-8711, способный вырабатывать экзометаболит с антимикробным действием (Патент РФ, 2021; Похиленко и соавт., 2022). Антимикробным веществом оказался пептид с молекулярной массой 3401 Да, близкий по молекулярной массе к субтилозину А (3398.9 Да), впервые описанному Babasaki и соавт. (Babasaki et al., 1985). Подобраны условия биосинтеза при глубинном культивировании и выбраны способы выделения антимикробного пептида, далее именуемого как субтилозин П19.

Цель данной работы — оценка и определение повреждающего действия субтилозина П19 на споры *B. anthracis* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и цитологического анализа.

Таблица 1. Определение спороцидной концентрации субтилозина П19 для штамма *B. anthracis* СТИ-1 после 60 мин экспозиции

КОЕ исходное, спор/мл	Количество проросших спор (КОЕ/мл) при разведении субтилозина П19*						
	1 : 10	1 : 100	1 : 1000	1 : 10000	1 : 100000	1 : 1000000	1 : 10000000
10 ⁶	0	0	0	0	2 ± 1	6 ± 1	14 ± 2
10 ⁷	0	0	0	0	3 ± 1	20 ± 3	43 ± 3

* Исходная концентрация субтилозина П19 – 5.54 мг/мл.

В качестве продуцента бактериоцина субтилозина П19 использовали штамм *B. subtilis* П19 природного происхождения (депонирован в Государственной коллекции “ГКПМ-Оболensk”, № В-8711) (Патент РФ, 2021).

Синтез, накопление и выделение бактериоцина осуществляли, как нами описано ранее (Патент РФ, 2021; Похиленко и соавт., 2022).

Действие субтилозина П19 исследовали на спорах вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (Государственная коллекция “ГКПМ-Оболensk”). Споры получали из вегетативных клеток путем выращивания на “голодном” LB-агаре в матрацах при температуре 33 ± 1°C в течение 3–7 сут (Маринин и соавт., 2009). С поверхности агара их смывали стерильным физраствором. В суспензии общее количество сибиреязвенных спор с помощью стандарта мутности Л.И. Тарасевича довели до 1 × 10⁷–1 × 10⁸ спор/мл.

При исследовании спороцидного действия субтилозина П19 (5.54 мг/мл) к 270 мкл каждого его разведения в дистиллированной воде вносили по 30 мкл взвеси спор (10⁷ и 10⁸ спор/мл). После экспозиции в течение 60 мин при комнатной температуре (22 ± 2°C) все опытные образцы объемом по 100 мкл высевали на чашки с ГРМ агаром (Арт. 16416, “ФБУН ГНЦ ПМБ”, Оболensk, Россия) состава (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12.0 г; пептон сухой ферментативный – 12.0 г; натрия хлорид – 6.0 г; агар микробиологический – 10.0 г. В другом варианте определения спороцидного действия субтилозина П19 к 150 мкл взвеси спор (10⁸ спор/мл) в физрастворе вносили по 150 мкл раствора бактериоцина в концентрации 0.07 мг/мл, перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и полученной смесью объемом по 100 мкл засеивали чашки с ГРМ агаром. Во всех вариантах определения спороцидного действия в качестве контроля использовали пробы без бактериоцина. Чашки с посева-

ми инкубировали в течение 2 сут при 34°C. Наличие роста на чашках с посевами анализировали визуально с подсчетом КОЕ. Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях.

Для электронно-микроскопических исследований суспензию спор штамма СТИ-1 (10⁸ спор/мл) в контрольных и опытных пробирках осаждали (13000 об./мин, 10 мин) на центрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия). Супернатанты отбрасывали, в контрольную пробирку добавляли 500 мкл физраствора, а в опытную – 500 мкл раствора субтилозина П19 с концентрацией около 6 мкг/мл. Пробы перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 1 ч и осаждали в том же режиме. Супернатанты снова отбрасывали, осадки однократно промывали стерильной дистиллированной водой, аликвоты которых отбирали для посева на ГРМ-агар. Затем в опытную и контрольную пробирки в качестве фиксатора добавляли по 1 мл 8% глутарового альдегида (“Serva”, Германия) на 0.2 М Na-какодилатном буфере с pH 7.2 и оставляли на 12 ч в холодильнике. Последующие процедуры проводили, как описано ранее (Герасимов и соавт., 2021, 2022). Срезы фиксированных спор получали на ультрамикротоме Ultracut (“Reichert Jung”, Австрия) с последующим контрастированием уранилацетатом и цитратом свинца.

Исследование ультратонких срезов осуществляли в трансмиссионном электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit BioTWIN (“FEI Company” Голландия, Чехия) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10 000 до 100 000 раз. Съемку производили с помощью CCD камер Orius SC 200 W 120 kV и Orius SC 1000 W 200 kV (“Gatan”, США). Снимки обрабатывали с помощью программы Digitalmicrograph (“Gatan”, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Excel 2016 с определением стандартного отклонения (Платонов, 2000).

Таблица 2. Определение начала спороцидного действия субтилозина П19 на *B. anthracis* СТИ-1

КОЕ спор/мл	Наличие роста бацилл (КОЕ/мл) после экспозиции с бактериоцином*, мин						
	0	5	10	15	20	40	60
10 ⁷	Сплошной	143 ± 39	11 ± 3	1.3 ± 0.5	0	0	0

* Концентрация субтилозина П19 — 35 мкг/мл.

В табл. 1 приведены средние данные по КОЕ после 60 мин экспозиции интактных спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 с различными концентрациями субтилозина П19. Из данных таблицы следует, что субтилозин П19 инактивирует сибиреязвенные споры штамма СТИ-1, и минимальная ингибирующая концентрация (МИК) субтилозина П19 при этом составляет 0.55 мкг/мл. В другом варианте опыта рост *B. anthracis* на ГРМ агаре прекращался, начиная с 5 мин экспозиции спор СТИ-1 с субтилозином П19 в концентрации 35 мкг/мл (табл. 2).

В опытных образцах спор, обработанных субтилозином П19 и предназначенных для электронно-микроскопических исследований, также отсутствовал рост штамма СТИ-1 на ГРМ агаре. В то же время контрольные пробы давали слитный рост.

На электронных микрофотографиях контрольных образцов у интактных спор *B. anthracis* четко просматриваются все структуры — стенки кора, кортекс и экзосориум, а в центральной части выявляются зародышевые цитоплазматические компартменты с ядерным аппаратом, эписомами и рибосомами (рис. 1а). На рис. 1б наблюдается картина полного лизиса спор от контакта с бактериоцином, что приводит к вытеканию цитоплазмы и нуклеоида. От спор остаются лишь их тени в виде остатков наружных покровов. По данным морфопопуляционного анализа более 99% спор получали необратимые изменения, приводившие к их гибели, что и подтвердили данные бактериологического исследования опытных и контрольных проб, приведенные выше.

Полученные результаты подтверждают имеющиеся сведения о том, что основным механизмом инактивации бактериоцинами бактериальных спор, также же, как и клеток, является нарушение целостности мембран (Egan et al., 2016; Romero-Rodríguez et al., 2023).

В литературе имеются данные об ингибирующем действии низина и галодеурацина на споры и

клетки *B. anthracis*. После инкубации в течение 5 ч МИК составляла 0.42 и 0.68 мкг/мл соответственно (Gut et al., 2008; Oman, van der Donk, 2009). Однако оба этих бактериоцина проявляют свой ингибирующий эффект только после инициации прорастания спор, поскольку они первично связываются с липидом II, который отсутствует на внешней оболочке покоящихся спор *B. anthracis* (Oman, van der Donk, 2009; Gut et al., 2011).

Таким образом, впервые с применением методов электронной микроскопии изучены особенности действия субтилозина П19 на покоящиеся споры *B. anthracis*. Совокупность полученных данных, в сочетании с анализом известных механизмов действия бактериоцинов, позволяют предположить, что в основе механизма инактивации спор, по-видимому, лежит множественное нарушение целостности внутренней и наружной мембран, окружающих кортекс покоящейся споры. Вероятно, также, что конфигурация молекулы субтилозина П19 позволяют ему проникать через внешние покровы и необратимо повреждать жизненно важные мембранные структуры спор возбудителя сибирской язвы с последующим вытеканием цитоплазмы. Более детальный механизм повреждающего действия субтилозина П19 на споры *B. anthracis* требует дальнейшего изучения. Активность субтилозина П19 в отношении возбудителя сибирской язвы делает его привлекательным в качестве основы спороцидного биопрепарата, а также как источника новых антимикробных препаратов природного происхождения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансировании из Федерального бюджета в рамках отраслевой НИР “Получение инкапсулированных препаратов для борьбы с бактериальными патогенами на основе штаммов, обладающих пробиотическими свойствами”. Регистрационный номер 121022000155-9. 01.2021–12.2025.

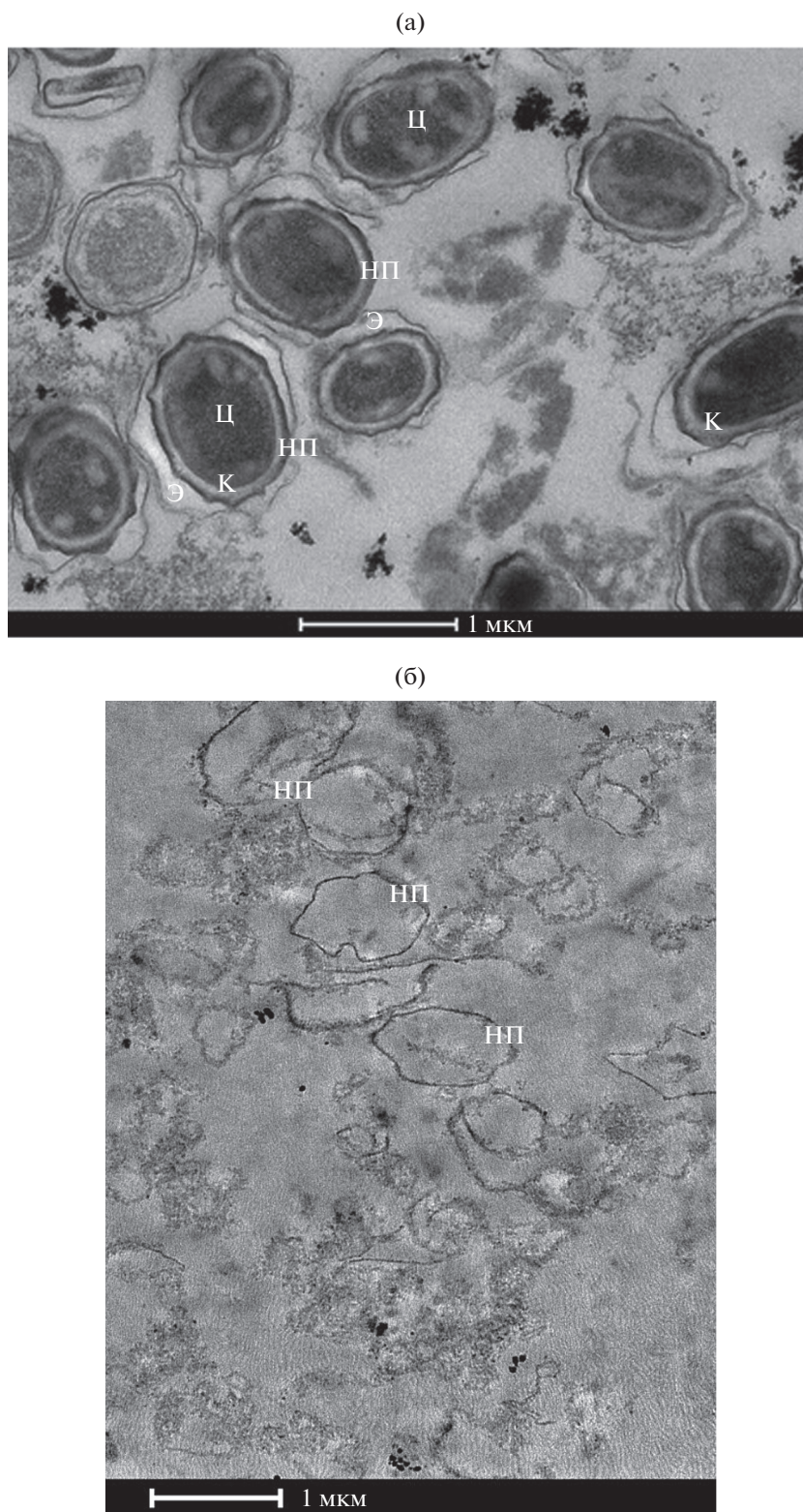


Рис. 1. Типичные трансмиссионные электронные микрофотографии: intactные споры *B. anthracis* СТИ-1 (а) и после контакта с бактериоцином П19 (3 мкг/мл) в течение 1 ч (б), $\times 30000$. Э – экзоспориум; НП – наружные покровы споры; Ц – цитоплазма с нуклеоидом; К – кортекс. Масштабная метка – 1 мкм.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Герасимов В.Н., Маринина Н.Н., Щербатая О.С., Харсеева Г.Г. Возможности трансмиссионной электронной микроскопии в оценке качества клеток бактерий и микробной популяции // Клиническая лабораторная диагностика. 2022. Т. 67. № 4. С. 237–243.
- Gerasimov V.N., Marinina N.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S. The possibilities of transmission electron microscopy in assessing the quality of bacterial cells and microbial population // Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Moscow). 2022. V. 67. P. 237–243.
- Герасимов В.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Котов С.А., Чепусова А.В. Особенности ультраструктуры смешанных биопленок возбудителя дифтерии и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта человека // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66. № 10. С. 623–628.
- Gerasimov V.N., Kharseeva G.G., Shcherbataya O.S., Kotov S.A., Chepusova A.V. Peculiarities of the ultrastructure of mixed biofilms of the causing agent of diphtheria and conditionally pathogenic microorganisms isolated from the human respiratory tract // Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Moscow). 2021. V. 66. P. 623–628.
- Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы / Под ред. Л.И. Маринина, И.А. Дятлова. М.: Гигиена, 2009. 304 с.
- Патент РФ. 2021. № 2758060.
- Платонов А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
- 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. Т. 7. № 1. С. 9–17.
- 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 (Obolensk Moscow reg.). 2022. V. 7 (1). P. 9–17.
- Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты / Под ред. Г.Г. Онищенко, И.В. Дармова, С.В. Борисевича. Сергиев Посад, 2018. 592 с.
- Babasaki K., Takao T., Shimonishi Y., Kurahashi K. Subtilisin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis // J. Biochemistry. 1985. V. 98. P. 585–603.
- Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? // Front. Microbiol. 2016. V. 7. Art. 461.
- Gut I.M., Blanke S.R., van der Donk W.A. Mechanism of inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by the lantibiotic nisin // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. P. 744–752.
- Gut I.M., Prouty A.M., Ballard J.D., van der Donk W.A., Blanke S.R. Inhibition of *Bacillus anthracis* spore outgrowth by nisin // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 4281–4288.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Stelow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. P. 548–572.
- Oman T.J., van der Donk W.A. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin // ACS Chem. Biol. 2009. V. 4. P. 865–874.
- Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis* // Infect. Genet. Evol. 2018. V. 64. P. 115–125.
- Romero-Rodríguez A., Ruiz-Villafán B., Martínez-de la Peña C.F., Sánchez S. Targeting the impossible: a review of new strategies against endospores // Antibiotics. 2023. V. 12. Art. 248.
- Wood J.P., Adrion A.C. Review of decontamination techniques for the inactivation of *Bacillus anthracis* and other spore-forming bacteria associated with building or outdoor materials // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 4045–4062.

Effect of the Bacteriocin Subtylosin P19 on *Bacillus Anthracis* Spores

V. D. Pokhilenko¹, *, V. N. Gerasimov¹, S. K. Zhigletsova¹, T. A. Kalmantaev¹,
I. A. Chukina¹, R. I. Mironova¹, and A. R. Gajtrafimova¹

¹ State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, 142279 Russia

*e-mail: pokhilenko@obolensk.org

Received March 15, 2023; revised May 31, 2023; accepted June 20, 2023

Abstract—This is the first report on electron microscopic investigation of the effect of bacteriocin on *Bacillus anthracis* dormant spores. The new bacteriocin, subtilisin P19, isolated from a natural *Bacillus subtilis* strain, effectively killed dormant *B. anthracis* spores at concentrations of 0.5–35 µg/mL after 60-min exposure. Our data, combined with analysis of the known mechanisms of the action of bacteriocins, suggest that the mechanism of spore inactivation was apparently based on multiple disruptions of the integrity of the inner and out-

er membranes surrounding the cortex of the resting spore. It is also likely that the molecular configuration of subtilisin P19 allows it to penetrate through the outer integuments and to damage the vital membrane structures of the anthrax spores. Subtilisin P19 can serve as a promising basis for new antimicrobial preparations of natural origin.

Keywords: *Bacillus anthracis*, spores, bacteriocin, subtilisin P19, transmission electron microscopy