

Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* в отношении ESKAPE-патогенов

Д.А.Чистякова, А.А.Шафикова, М.В.Спивак, И.А.Лягина, А.Р.Мелкумян, Б.А.Нанаева,
А.В.Варданян, С.И.Ачкасов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава
России, Москва, Российская Федерация

Цель исследования. Изучение антагонистического действия лактобацилл в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы. Для эксперимента были созданы 2 группы микроорганизмов: «хищники» и «жертвы». К «хищникам» были отнесены 19 штаммов лактобацилл. В группу «жертв» были отобраны 6 различных видов микроорганизмов из группы ESKAPE-патогенов, обладающих антибиотикорезистентностью. Для поиска штаммов лактобацилл, синтезирующих бактериоцины, применяли метод двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы.

Результаты. Оценка антагонистического действия бактериоцина изученных лактобацилл проводилась по отношению к 10 штаммам – представителям каждого вида микроорганизмов с выявленной полирезистентностью к антибактериальным препаратам. По данным анализа получено, что бактериоцины определенных штаммов лактобацилл проявили подавляющее действие в больших разведениях.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что антагонистическое действие лактобацилл в отношении полирезистентных микроорганизмов заключается в продуцировании ими бактериоцинов, обладающих узконаправленной или широкой активностью в отношении антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

Ключевые слова: бактериоцины, лактобациллы, аутопробиотики, антибиотикорезистентность, антагонистическая активность

Для цитирования: Чистякова Д.А., Шафикова А.А., Спивак М.В., Лягина И.А., Мелкумян А.Р., Нанаева Б.А., Варданян А.В., Ачкасов С.И. Антагонистическая активность бактерий рода *Lactobacillus* в отношении ESKAPE-патогенов. Бактериология. 2024; 9(4): 115–119. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-115-119

Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria against ESKAPE pathogens

D.A.Chistyakova, A.A.Shafikova, M.V.Spivak, I.A.Lyagina, A.R.Melkumyan, B.A.Nanaeva,
A.V.Vardanyan, S.I.Achkasov

Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology, Moscow, Russian Federation

Objective. To study the antagonistic action of lactobacilli strains against antibiotic-resistant strains of microorganisms.

Materials and methods. For the experiment, 2 groups of microorganisms were created: “predators” and “victims”. 19 strains of lactobacilli were classified as “predators”. 6 different types of microorganisms from the ESKAPE group – pathogens with antibiotic resistance – were selected for the “victim” group. For searching lactobacilli strains that synthesize bacteriocins, we used a two-stage cultivation method of the microorganism-antagonist and the test culture under the conditions of a combined system.

Results. The antagonistic effect of the bacteriocin of the studied lactobacilli was assessed for 10 strains, representatives of each type of microorganism with revealed multiresistance to antibacterial drugs. According to the analysis, it was found that bacteriocins of certain strains of lactobacilli showed an inhibitory effect in high dilutions.

Conclusion: the results obtained indicate that the antagonistic effect of lactobacilli against multidrug-resistant microorganisms consists in their production of bacteriocins with narrowly targeted or broad activity against antibiotic-resistant strains of bacteria.

Key words: bacteriocins, lactobacilli, autoprobiotics, antibiotic resistance, antagonistic activity

For citation: Chistyakova D.A., Shafikova A.A., Spivak M.V., Lyagina I.A., Melkumyan A.R., Nanaeva B.A., Vardanyan A.V., Achkasov S.I. Antagonistic activity of *Lactobacillus* bacteria against ESKAPE pathogens. Bacteriology. 2024; 9(4): 115–119. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-115-119

Для корреспонденции:

Чистякова Дарья Алексеевна, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Адрес: 123423, Москва, ул. Салаям Адля, 2

Статья поступила 27.04.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Daria A. Chistyakova, Junior Research assistant of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Address: 2 Salam Adil str., Moscow, 123423, Russian Federation

The article was received 27.04.2024, accepted for publication 25.12.2024

Распространение резистентных к антибактериальным препаратам штаммов микроорганизмов и их неуклонный рост во всем мире снижает эффективность лечения инфекций, вызванных полирезистентными бактериями. Поэтому чрезвычайно актуальны исследования, направленные на поиск новых альтернативных методов лечения. Лактобациллы являются одним из микроорганизмов, которые, обладая способностью к синтезу новых антибактериальных веществ класса бактериоцинов, оказывают выраженное антагонистическое воздействие как на грамположительные, так и на грамотрицательные патогенные бактерии [1].

Бактериоцины представляют собой вещества белковой природы, содержащие в своей структуре полипептиды, белки, полисахариды, обладающие активностью в отношении одного или нескольких штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [2].

В последние годы был опубликован ряд исследований, показывающих, что бактериоцины могут использоваться в качестве альтернативы антибактериальным препаратам для профилактики и/или лечения бактериальных инфекций [3, 4]. В доступных источниках не были обнаружены данные о развитии резистентности микроорганизмов к бактериоцинам благодаря наличию быстрого механизма порообразования, подверженности разложению протеолитическими ферментами и короткому биологическому периоду полувыведения из организма человека [5].

В последние годы ряд исследований показали, что бактериоцины лактобацилл влияют на микробный спектр желудочно-кишечного тракта, устраняя патогены, а также защищая кишечник от возможной бактериальной колонизации. Бактериоцины лактобацилл способны ингибировать такие патогенные микроорганизмы, как *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* [6, 7]. Было показано, что некоторые бактериоцины очень эффективны при лечении инфекций, вызванных штаммами с лекарственной устойчивостью [8]. Учитывая масштаб распространения резистентных штаммов и снижение эффективности существующих схем антибиотикотерапии в клинической практике, бактериоцины, полученные из лактобацилл, можно рассматривать как альтернативный и достаточно перспективный путь в лечении кишечных инфекций [9, 10].

Цель исследования: изучение антагонистического действия лактобацилл в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, находящиеся в коллекции референс-центра Минздрава России, созданного на базе ФГБУ НМИЦ колопроктологии им. А.Н.Рыжих. Для эксперимента были созданы 2 группы микроорганизмов: «хищники» и «жертвы». К «хищникам» были отнесены 19 штаммов лактобацилл: *Levilactobacillus brevis* ($n = 4$), *Ligilactobacillus salivarius* ($n = 3$), *Limosilactobacillus fermentum* ($n = 3$), *Lactiplantibacillus pentosus* ($n = 2$), *Lactiplantibacillus plantarum*

($n = 2$), *Lactobacillus johnsonii* ($n = 2$), *Lactobacillus delbrueckii* ($n = 2$), *Lactobacillus gasseri* ($n = 1$).

В группу «жертв» были отобраны ESKAPE-патогены, которые обладают резистентностью к различным группам антибиотиков, что превращает их в настоящий бич стационара: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *S. aureus*.

Представители исследуемых групп («жертвы» – «хищники») хранились в криобанке при температуре -80°C . Восстановление лактобацилл проводили в MRS-бульоне (Condalab, Испания), затем высевали на плотную питательную среду MRS (Condalab, Испания) и термостатировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе, а микроорганизмы из группы «жертв» высевались на плотные селективные питательные среды.

Для поиска штаммов, синтезирующих бактериоцины, применяли метод двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы [11].

Результат оценивали по зонам задержки роста: от 25 до ≥ 40 мм – высокая; 25–15 мм – средняя; 5–15 мм – низкая антагонистическая активность; ≤ 5 мм – антагонизм отсутствует (рис. 1).

Клеточную суспензию лактобацилл («хищников») мутностью 1 McF в количестве 1 мл вносили в 10 мл MRS-бульона и инкубировали 48 ч в CO_2 -инкубаторе. Бактериальные клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 3000 оборотов 10 мин. Для определения минимальной подавляющей концентрации активного пробиотического вещества лактобацилл использовали супернатант культуральной жидкости методом серийных разведений. Предварительно в каждую лунку добавляли 100 мкл бульона Мюллера–Хинтона (Condalab, Испания), в которые затем вно-

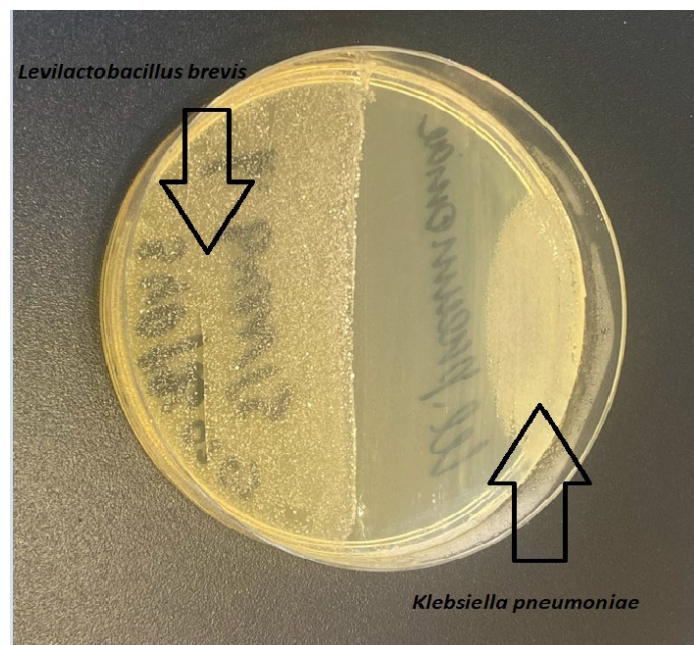


Рис. 1. Комбинированная система культивирования бактерий для полуколичественной оценки антагонистической активности *L. brevis* относительно *K. pneumoniae*.

Fig. 1. A combined bacterial culture system for a semi-quantitative assessment of the antagonistic activity of *L. brevis* relative to *K. pneumoniae*.

Таблица. Антагонистическая активность лактобацилл в отношении микроорганизмов с полирезистентностью
Table. Antagonistic activity of lactobacilli against microorganisms with polyresistance High Medium Low

Штаммы лактобацилл / Lactobacillus strains	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Escherichia coli</i>			<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low	Высокая / High	Средняя / Medium	Низкая / Low
<i>L. johnsonii</i> 214	+			+					+	+					+
<i>L. fermentum</i> 353	+			+					+	+				+	
<i>L. brevis</i> 13		+			+				+			+		+	
<i>L. delbrueckii</i> CTR101ZT	+				+							+		+	
<i>L. johnsonii</i> 8M15Д			+			+			+						
<i>L. delbrueckii</i> 296c21			+		+										+
<i>L. fermentum</i> 515												+			
<i>L. gasseri</i> 5M140		+			+					+					+
<i>L. brevis</i> 340		+			+					+					+
<i>L. salivarius</i> 75c	+			+			+			+			+		
<i>L. brevis</i> 472	+			+			+			+			+		
<i>L. pentosus</i> 3022						+			+						+
<i>L. pentosus</i> 222	+			+			+			+			+		
<i>L. brevis</i> 224	+			+								+			+
<i>L. plantarum</i> 20A	+			+			+			+			+		
<i>L. salivarius</i> 253Z21	+			+			+			+			+		
<i>L. fermentum</i> 18A	+			+			+			+			+		
<i>L. plantarum</i> 19A	+			+			+			+			+		
<i>L. salivarius</i> 24c_23	+			+			+			+			+		

сили по 100 мкл суспензии мутностью 0,5 McF микроорганизмов («жертвы») и далее добавляли по 100 мкл соответствующих разведений супернатанта. Планшеты инкубировали в термостате в течение 24–48 ч при температуре 37°C. Результат оценивали визуально. Из лунок, в которых отсутствовал рост микроорганизмов, проводили высев на питательные среды.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам определения антагонистической активности методом двухэтапного культивирования микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы лактобацилл ранжировались в зависимости от степени их антагонистической активности на высокую, среднюю и низкую (таблица).

Среди 19 исследуемых лактобацилл наибольшую антагонистическую активность проявили 10 штаммов микроорганизмов семейства *Lactobacillaceae* рода *Lactobacillus*: *L. salivarius* 75c, *L. brevis* 472, *L. pentosus* 222, *L. plantarum* 20A, *L. salivarius* 253Z21, *L. fermentum* 18A, *L. plantarum* 19A, *L. salivarius* 24c_23, *L. brevis* 224, *L. fermentum* 353 (рис. 2).

Оценка антагонистического действия бактериоцина изученных лактобацилл проводилась по отношению к 10 представителям каждого вида полирезистентных микроорганизмов. По данным оценки выявлено, что бактериоцины определенных штаммов лактобацилл проявили подавляющее действие в больших разведениях. В частности, при оценке

действия бактериоцина к полирезистентным представителям вида *P. aeruginosa* бактериоцин от *L. salivarius* 75c в 1 случае проявил активность в разведении 1/16, также в 1 случае – в разведении 1/8. Остальные лактобациллы проявили активность в меньших разведениях.

При оценке действия бактериоцина к полирезистентным представителям вида *K. pneumoniae* бактериоцин от

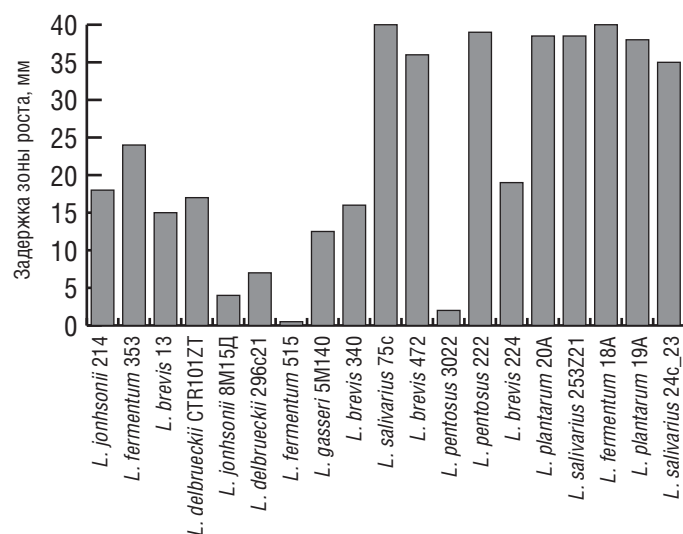


Рис. 2. Активность лактобацилл в отношении микроорганизмов с полирезистентностью.

Fig. 2. Activity of lactobacilli against microorganisms with polyresistance.

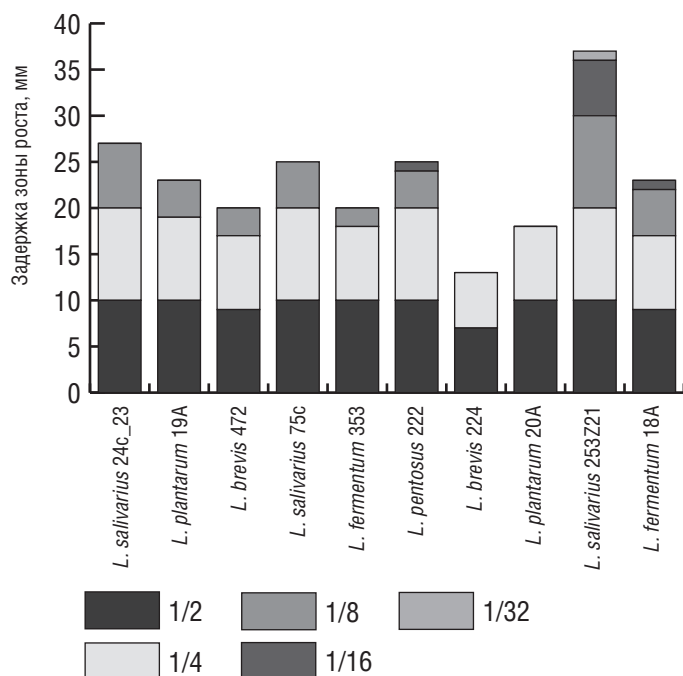


Рис. 3. Случаи подавления роста представителей вида *K. pneumoniae* бактериоцинами (в разведениях) исследуемых лактобацилл.

Fig. 3. Cases of suppression of the growth of representatives of the *K. pneumoniae* species by bacteriocins (in dilutions) of the studied lactobacilli.

L. salivarius 253Z21 в 1 случае проявил активность в разведении 1/32, в 6 случаях – в разведении 1/16. Остальные лактобациллы проявили активность в меньших разведениях (рис. 3).

Антагонистическое действие бактериоцина к полирезистентным представителям вида *E. coli*: бактериоцин от *L. salivarius* 253Z21 в одном случае проявил активность в разведении 1/8.

Однако при исследовании антагонистических свойств бактериоцинов лактобацилл было отмечено отсутствие действия на представителей грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*, *Enterococcus* spp.).

Таким образом, перспективными для дальнейшего изучения антагонистического действия бактериоцинов являются 2 штамма лактобацилл: *L. salivarius* 253Z21 и *L. salivarius* 75c.

Заключение

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что лактобациллы способны продуцировать вещества (бактериоцины), обладающие антагонистическими свойствами в отношении полирезистентных микроорганизмов.

Первый этап исследования позволил выявить 10 штаммов лактобацилл, обладающих высокой антагонистической активностью в отношении полирезистентных грамотрицательных бактерий. При дальнейшем исследовании супернатанта высокоактивных лактобацилл отмечено, что 2 штамма лактобацилл (*L. salivarius* 253Z21 и *L. salivarius* 75c) являются продуцентами бактериоцинов, которые в перспективе могут использоваться в качестве альтернативы антибактериальным препаратам при лечении бактериальных ин-

фекций у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника.

Информация о финансировании

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания №1023022000100-9-1.6.2.

Financial support

The study was conducted as part of the implementation of state assignment No 1023022000100-9-1.6.2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

- Kohoutova D, Forstlova M, Moravkova P, Cyran J, Bosak J, Smajs D, et al. Bacteriocin production by mucosal bacteria in current and previous colorectal neoplasia. BMC Cancer. 2020 Jan 16;20(1):39. DOI: 10.1186/s12885-020-6512-5
- Anjana, Tiwari SK. Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2022 May 16;12:851140. DOI: 10.3389/fcimb.2022.851140
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizadeh Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal. 2022 Jan;36(1):e24093. DOI: 10.1002/jcla.24093
- Fernandes A, Jobby R. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential clinical applications. Appl Biochem Biotechnol. 2022 Oct;194(10):4377-4399. DOI: 10.1007/s12010-022-03870-3
- Dicks LMT, Dreyer L, Smith C, van Staden AD. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut-Blood Barrier? Front Microbiol. 2018 Sep 28;9:2297. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02297
- Liu Z, Xu C, Tian R, Wang W, Ma J, Gu L, et al. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances. J Zhejiang Univ Sci B. 2021 Jul 15;22(7):533-547. DOI: 10.1631/jzus.B2000602
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. J Biosci Bioeng. 2022 Oct;134(4):277-287. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.07.007
- Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. Nat Rev Microbiol. 2021 Nov;19(11):726-739. DOI: 10.1038/s41579-021-00569-w
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Apr;100(7):2939-51. DOI: 10.1007/s00253-016-7343-9
- Garbacz K. Anticancer activity of lactic acid bacteria. Semin Cancer Biol. 2022 Nov;86(Pt 3):356-366. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.12.013
- Сухина МА, Жуховицкий ВГ, Шельгин ЮА. Способ оценки антагонистической активности лактобацилл толстокишечного биотопа пациента относительно разнообразных бактерий двухэтапным культивированием микроорганизма-антагониста и тестируемой культуры в условиях комбинированной системы. 2018. / Sukhina MA, Zhukhovitskii VG, Shelygin YuA. Sposob otsenki antagonistscheskoi aktivnosti laktobatsill tolstokishechnogo biotopa patsienta otnositel'no raznoobraznykh bakterii dvukhetapnym kul'tivirovaniem mikroorganizma-antagonista i testiruemoi kul'tury v usloviyakh kombinirovannoi sistemy. 2018. (In Russian).

Информация о соавторах:

Шафикова Анастасия Александровна, врач-бактериолог отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Спивак Михаил Владимирович, младший научный сотрудник отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Лягина Ирина Анатольевна, заведующая лабораторией микробиологии-биолог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Мелкумян Алина Рантиковна, кандидат медицинских наук, руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Нанаева Бэлла Александровна, кандидат медицинских наук, заведующая гастроэнтерологическим отделением ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Варданян Армен Восканович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением хирургии воспалительных заболеваний кишечника ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих»

Ачкасов Сергей Иванович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н.Рыжих» Минздрава России

Information about co-authors:

Anastasia A. Shafikova, bacteriologist-doctor of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Mikhail V. Spivak, Junior Research assistant of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Irina A. Lyagina, Head of microbiological Laboratory-biologist, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Alina R. Melkumyan, MD, PhD, Head of the Department of Microbiological and Immunological Research, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Bella A. Nanaeva, MD, PhD, Head of Gastroenterology Department, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Armen V. Vardanyan, MD, PhD, Head of the IBD surgery department, Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

Sergey I. Achkasov, corresponding RAS member, MD, PhD, DSc, professor, Director of Ryzhikh National Medical Research Center of Coloproctology

НОВОСТИ НАУКИ

Борьба с туберкулезом

Исследователи выявили новые молекулы антибиотиков, которые направлены на *Mycobacterium tuberculosis* и делают ее менее патогенной для человека. Кроме того, некоторые из обнаруженных веществ могут позволить возобновить лечение туберкулеза имеющимися препаратами – в том числе штаммов бактерии, которые уже выработали устойчивость к лекарствам.

Разработана альтернативная стратегия лечения заболевания. Были использованы высокопроизводительные методы на основе клеток-хозяев, чтобы проверить способность молекул останавливать размножение бактерий в иммунных клетках человека: Из 10 000 молекул эта процедура позволила выделить несколько, свойства которых они более тщательно изучили в ходе исследования.

В итоге исследователи выявили блокаторы вирулентности, использующие структуры-мишени, принципиально отличные от тех, на которые нацелены классические антибиотики. Эти молекулы, вероятно, приводят к значительно меньшему селективному давлению на бактерию, а значит, и к меньшей резистентности.

Обнаружили, что некоторые из вновь выявленных химических веществ являются молекулами двойного действия. Они не только воздействуют на факторы вирулентности патогена, но и усиливают активность монооксигеназ – ферментов, необходимых для активации обычного антибиотика этионамида. Этионамид – препарат, который уже много десятилетий используется для лечения туберкулеза. Это так называемое пролекарство – вещество, которое должно быть ферментативно активировано в бактерии, чтобы убить ее. Таким образом, открытые молекулы действуют как пролекарства, обеспечивая еще один альтернативный подход к разработке традиционных антибиотиков. Был расшифрован точный молекулярный механизм этого бустерного эффекта. Таким образом, в сочетании с этими новыми активными веществами лекарства, которые уже используются против туберкулеза, могут эффективно применяться и в будущем.

Это открытие предлагает несколько привлекательных отправных точек для разработки новых и крайне необходимых средств против туберкулеза.

Gries R, Chhen J, van Gumpel E, Theobald SJ, Sonnenkalb L, Utpatel C, et al.
Discovery of dual-active ethionamide boosters inhibiting the *Mycobacterium tuberculosis* ESX-1 secretion system.
Cell Chem Biol. 2023 Dec 27:S2451-9456(23)00436-1. DOI: 10.1016/j.chembiol.2023.12.007