

2
НОМЕР

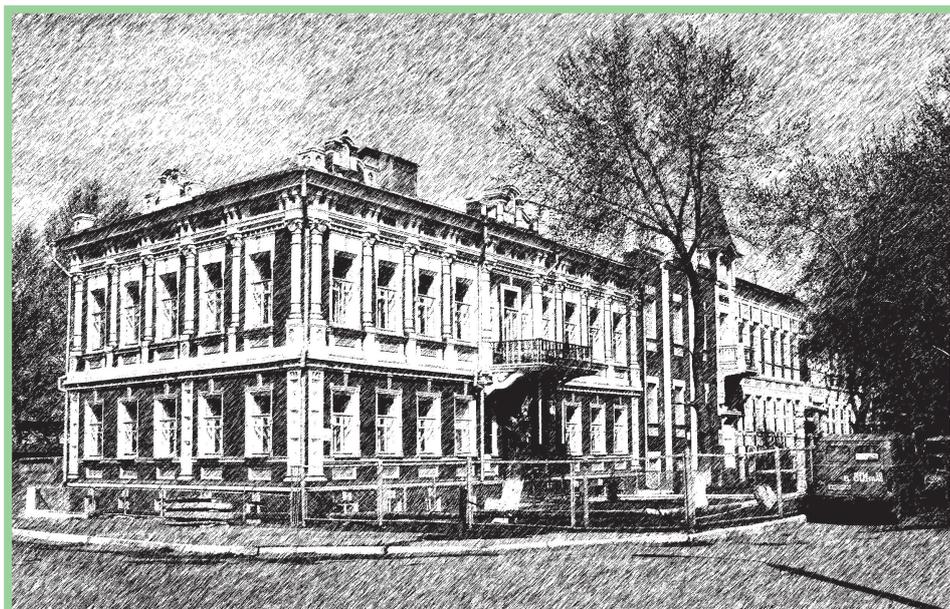


ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 579.61

А.С. Васильченко^{1,2}, Н.И. Дерябина¹, Е.А. Рогожин³, А.В. Вальшев²

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНОГО ВЕЩЕСТВА, ПРОДУЦИРУЕМОГО *ENTEROCOCCUS FAECIUM*

¹ Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

³ Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

Цель: выделить и охарактеризовать бактериоциноподобное вещество (БПВ), продуцируемое штаммом *E. faecium* ИКВС 8.

Материалы и методы. В данном исследовании использовали жидкостную хроматографию низкого давления и флуоресцентную спектроскопию.

Результаты. Методом хроматографии из культуральной среды *E. faecium* ИКВС 8 выделено БПВ с молекулярной массой около 10-15 кДа. Методом серийных разведений установлена минимальная ингибирующая концентрация выделенного биологически активного вещества (1,56 мкг/мл).

Ключевые слова: энтерококки, бактериоцины, энтероцины, бактериоциноподобное вещество.

A.S. Vasilchenko^{1,2}, N. I. Deryabina¹, E.A. Rogozhin³, A.V. Valyshev²

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCE PRODUCED BY ENTEROCOCCUS FAECIUM

¹ Orenburg State University, Orenburg, Russia

² Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis Ur RAS, Orenburg, Russia

³ Institute of Bioorganic Chemistry named academicians M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov, RAS, Moscow, Russia

Objective. Isolation and characterization of the mode of action of bacteriocin-like substance (BLIS) produced by the strain *E. faecium* ICIS 8.

Materials and methods. A low pressure liquid chromatography and a fluorescence spectroscopy were used in this study.

Results. Using a various methods of chromatography the BLIS produced by *E. faecium* ICIS 8 was purified. It was shown that the molecular weight of the BLIS is close to 10-15 kDa; the minimal inhibitory concentration of the BLIS determined against *L. monocytogenes* was 1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: enterococci, bacteriocins, enterocins, bacteriocin-like substance.

Введение

Энтерококки, входящие в состав нормальной микрофлоры кишечника человека, обеспечивают колонизационную резистентность организма хозяина. Одним из механизмов антагонистической активности энтерококков явля-

ется их способность продуцировать бактериоцины (энтероцины).

Бактериоцины – это бактериальные белки или пептиды, синтезируемые на рибосомах и обладающие антимикробным действием. Известно, что на проявление антагонистической активности энтероцинов влияют температура, электрическое поле, консистенция и состав среды, pH, присутствие Ca^{2+} и Mg^{2+} , а также специфические феромоны. В зависимости от физико-химических свойств, аминокислотного состава, а также спектра антимикробного действия энтероцины подразделяют на 4 класса [2].

К первому классу бактериоцинов относятся лантибиотики – низкомолекулярные катионные, гидрофобные, устойчивые к нагреванию пептиды с молекулярной массой 2-5 кДа, в составе которых присутствует аминокислота лантионин. Второй класс – это немодифицируемые пептиды с молекулярной массой до 10 кДа. Третий класс – крупные белки с молекулярной массой более 30 кДа. Четвёртый класс включает циклические пептиды с молекулярной массой 7-10 кДа, которые представляют собой полипептидную цепь, замкнутую в кольцо [1, 2].

Бактериоцины различаются по механизму своего действия на бактериальную клетку. Бактериоцины могут нарушать жизнеспособность бактериальных клеток путем образования пор в цитоплазматической мембране клетки-мишени, влиять на синтез муреинового слоя клеточной стенки или расщеплять его ферментативным путем [3].

Целью исследования явилось выделение антимикробного вещества штамма энтерококка и характеристика его биологической активности.

Материалы и методы

Объектом исследования послужил непатогенный штамм *E. faecium* ИКВС 8, чья антагонистическая в отношении *Listeria monocytogenes* была выявлена ранее [4].

Бактериоциноподобное вещество (БПВ) получали при культивировании энтерококков в бульоне Schaedler при температуре 37°C в течение 48 ч. Клетки из среды удаляли центрифугированием; культуральную жидкость концентрировали на вакуумном концентраторе. Белково-пептидные компоненты культуральной среды осаждали ацетоном, взятым в соотношении 1:7 при 4°C. Полученный осадок высушивали и перерастворяли в дистиллированной воде с последующей оценкой антимикробной активности методом диффузии в агар в отношении *L. monocytogenes* 88 ВК.

Следующим этапом выделения БПВ была одностадийная хроматография с использованием силикагелевого обращенно-фазового сорбента на колонке Synchronprep RP-P C8 в условиях низкого давления. Элюцию с колонки проводили 80% водным раствором ацетонитрила в 0,01% трифторуксусной кислоте с последующей лиофилизацией. Полученное вещество перерастворяли в дистиллированной воде и проверяли на наличие антимикробной активности.

В дальнейшем БПВ очищали от примесей методом жидкостной эксклюзионной хроматографией низкого давления на колонке BioSep-SEC-s2000 (7.8 × 300 mm) (Phenomenex, USA), интегрированной в ВЭЖХ-систему “Knauer SmartLine” (Germany). Элюирование с колонки проводили в изократическом режиме 12% раствором ацетонитрила в 0,01% трифторуксусной кислоте. Полученные фракции лиофилизировали, далее перерастворяли в дистиллированной воде и проверяли на наличие антимикробной активности. Белки и пептиды – маркеры молекулярной массы (Amersham Biosciences, USA) – элюировали с колонки в тех же условиях, что и целевое вещество: бычий сывороточный альбумин (66 кДа), овальбумин (45кДа), β-лактоглобулин (18,4 кДа), окситоцин (1,1 кДа).

Минимальную ингибирующую концентрацию выделенного бактериоциноподобного вещества определяли методом серийных разведений [5]. Мембраноповреждающее действие выделенного БПВ оценивали методом спектрофлуориметрии с флуоресцентными красителями SYTO 9 и иодида пропидием. Регистрацию спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Флюорат-02 Панорама (Люмэкс, Санкт-Петербург). Опытная проба содержала клетки *L. monocytogenes* 88 ВК и бактериоциноподобное вещество в минимально-ингибирующей концентрации. В отрицательный контроль были добавлены клетки *L. monocytogenes* 88 ВК в дистиллированной воде; в положительном контроле бактерии инкубировали в 70% этиловом спирте.

Результаты и обсуждение

Методами хроматографии из культуральной среды энтерококка было выделено бактериоциноподобное вещество (БПВ), обладающее выраженной антилистериозной активностью.

При разделении методом эксклюзионной хроматографии получено 11 фракций, из которых биологической активностью обладала одна (рис. 1). Со-

поставление времени удержания целевого вещества и различных маркерных веществ с известными молекулярными массами позволило определить приблизительную молекулярную массу БПВ. Так, выход фракции, обладающей активностью, зафиксирован на 14,98 мин, что близко к времени выхода β -лактоглобулина (15,93 мин), молекулярная масса которого 18,4 кДа.

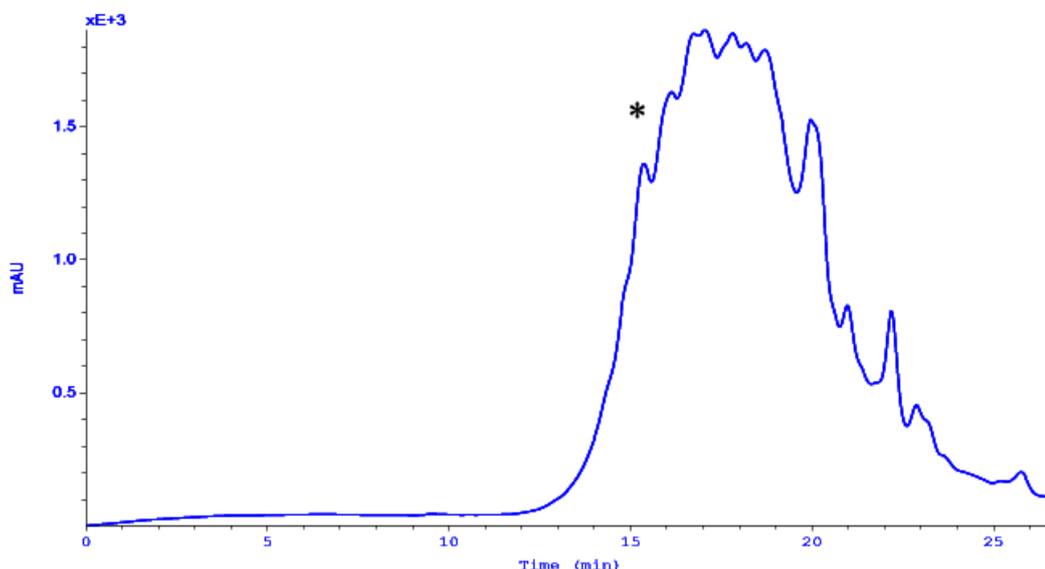


Рис. 1. Профиль разделения обессоленного белково-пептидного препарата, полученный методом эксклюзионной хроматографии. * - биологически активная фракция.

Оценка динамики роста клеточной популяции *L. monocytogenes* 88 ВК с внесением БПВ позволила определить ингибирующую концентрацию, составившую 1,56 мкг/мл (рис. 2).

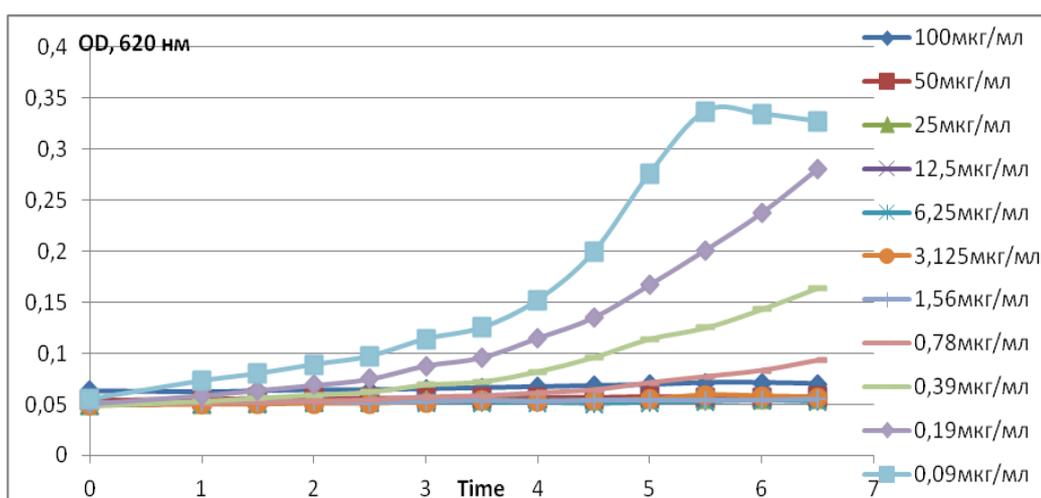


Рис. 2. Динамика роста клеточной популяции *L. monocytogenes* 88 ВК при воздействии бактериоциноподобного вещества *E. faecium* ИКВС 8.

С помощью флуоресцентных красителей был определен мембрано-

повреждающий характер действия выделенного бактериоциноподобного вещества (рис. 3). Так, в опытной пробе детектируются клетки с нарушенной целостностью клеточных барьерных структур, о чём свидетельствует превалирование флуоресценции пропидия иодида над флуоресценцией SYTO 9.

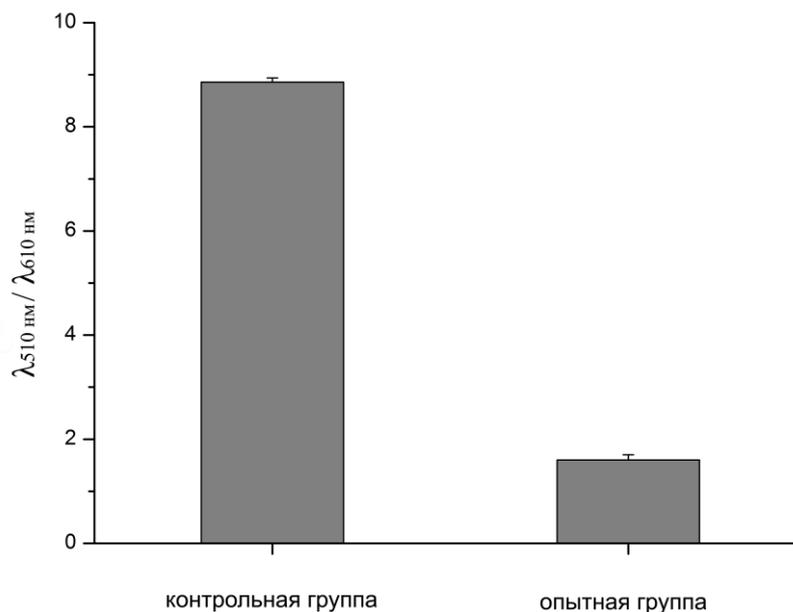


Рис 3. Оценка целостности барьерных структур *L.monocytogenes* 88 ВК при воздействии бактериоциноподобного вещества. Ось ординат – соотношение интенсивности максимумов флуоресценции SYTO 9 к иодиду пропидия.

В то же время, популяция листерий в контроле была представлена преимущественно интактными клетками, о чём свидетельствует флуоресценция, главным образом, SYTO 9, проникающего через неповрежденные барьерные структуры клеток (рис. 3).

Заключение

Таким образом, с использованием хроматографических методов из культуральной среды *Enterococcus faecium* ИКВС 8 выделено бактериоциноподобное вещество с молекулярной массой 10-15 кДа и установлена его минимальная ингибирующая концентрация, которая составила 1,56 мкг/мл. Использование флуоресцентных ДНК-тропных красителей (SYTO 9 и иодида пропидия) позволило установить мембрано-повреждающее действие выделенного вещества.

(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 15-4-4-28; стипендии Президента РФ для молодых ученых – №№ SP-943.2015.4 ; SP-2093.2015.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования. Вестник СПбГУ. 2009. 3: 78-93.
2. Cotter P. D., Ross R.P. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nature Reviews Microbiology. 2006. 4: 1-2.
3. Snyder A.B., Worobo R.W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. J. Sci. Food. Agric. 2014: 94: 28-44.
4. Вальшев А.В., Васильченко А.С. Морфологические изменения клеток листерий под действием метаболитов энтерококков кишечной микрофлоры человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. 6: 78-81.
5. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols. 2008. 3: 163-175.

Поступила 23.05.2016

(Контактная информация: **Вальшев Александр Владимирович** – к.м.н., заведующий лабораторией дисбиозов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел./факс 8 (3532) 775417, e-mail: valyshev@esoo.ru)

LITERATURA

1. Ermolenko E.I. Bakteriociny jenterokokkov: problemy i perspektivy ispol'zovanija. Vestnik SPbGU. 2009. 3: 78-93.
2. Cotter P. D., Ross R.P. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. Nature Reviews Microbiology. 2006. 4: 1-2.
3. Snyder A.B., Worobo R.W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: Antimicrobial peptides for food safety. J. Sci. Food. Agric. 2014: 94: 28-44.
4. Valyshev A.V., Vasil'chenko A.S. Morfologicheskie izmenenija kletok listerij pod dejstviem metabolitov jenterokokkov kishečnoj mikroflory cheloveka. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2014. 6: 78-81.
5. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols. 2008. 3: 163-175.

Образец ссылки на статью:

Васильченко А.С., Дерябина Н.И., Рогожин Е.А., Вальшев А.В. Выделение и характеристика бактериоциноподобного вещества, продуцируемого *Enterococcus faecium*. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 6с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/VAS-2016-2.pdf>).