

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕПТИДАЗЫ M23, ПРОДУЦИРУЕМОЙ БАКТЕРИЯМИ РОДА *LACTOBACILLUS* ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С БАКТЕРИЯМИ РОДА *KLEBSIELLA*

Горбушин А.А. (ИТМО), Пометун А.А. (ФИЦ Биотехнологии РАН), Логинова А.А. (ФИЦ Биотехнологии РАН), Тишков В.И. (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Научный руководитель – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Агеевец В.А. (ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА РОССИИ)

Введение. Внутрибольничные инфекции являются актуальной проблемой в наши дни. Бактерии рода *Klebsiella* являются ярким примером возбудителей таких инфекций. При проведённом совместном культивировании бактерий родов *Lactobacillus* и *Klebsiella*, были обнаружены 2 штамма *Limosilactobacillus reuteri* LR1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, проявившие антагонизм к бактериям рода *Klebsiella* [1]. В ходе изучения данных штаммов *Lactobacillus* при их совместном культивировании с бактериями рода *Klebsiella* выяснилось, что в ответ на действие патогена лактобактерии синтезируют ряд белков. Анализ с помощью тандемной MALDI/TOF/TOF спектрометрии показал, что среди этих белков есть пептидазы P60 и M23 из *L. reuteri*, а также белки, которые синтезируются только в ответ на присутствие клебсиелл: цистеинсинтаза A (CysK), L лактатдегидрогеназа (L-LDH) из *L. reuteri* и D-лактатдегидрогеназа (D-LDH) из *L. rhamnosus* [1]. Проведено клонирование генов нескольких ферментов из лактобактерий *Limosilactobacillus reuteri* LR1 (штамм был любезно предоставлен институтом молочной промышленности ВНИМИ). Получены рекомбинантные ферменты в активной и растворимой форме. Проведен скрининг антибактериальной активности полученных рекомбинантных белков и было установлено, что антибактериальной активностью обладает пептидаза M23. Изучение антимикробного действия данного белка M23, наиболее актуально в связи с ежегодным ростом устойчивости бактерий рода *Klebsiella* к антибиотикам [2].

Основная часть. Методом серийных микроразведений на среде Мюллера-Хинтон была выявлена собственная антимикробная активность (минимальная подавляющая концентрация, далее МПК) пептидазы M23 в отношении типовых штаммов *S. aureus* ATCC 29213, МПК = 0,125 мкг/мл; *K. pneumoniae* ATCC 13883, МПК <0,002 мкг/мл; *E. coli* ATCC 25922, МПК = 0,015 мкг/мл; а также на 2 клинических изолятах *S. aureus* 1243, МПК = 0,25 мкг/мл, и *S. aureus* 1380, МПК = 0,25 мкг/мл

Синергизм пептидазы M23 оценивался двумя методами: оценка кинетики отмирания исследуемых культур под действием антибиотиков; оценка с помощью модифицированного диско-диффузионного метода на плотной питательной среде. В качестве препаратов оценки были выбраны препараты тигециклин, цефтазидим, цефтазидим/авибактам, азтреонам, цефокситин, меропенем, линезолид, клиндамицин, цiproфлоксацин. В ходе оценки кинетики отмирания исследуемых культур был выявлен синергизм меропенема (16 мкг/мл) с пептидазой M23 (0,25 мкг/мл) в отношении клинического изолята *K. pneumoniae* 3924, однако, в отношении изолята *E. coli* 3906 в тех же условиях синергизма не наблюдалось. Выявлен синергизм цефокситина (16 мкг/мл) с пептидазой M23 (0,25 мкг/мл) в отношении изолята *S. aureus* 1380. Оценка синергизма диско-диффузионным методом на Мюллер-Хинтон агаре, содержащем пептидазу M23, дала следующие результаты: M23 (0,2 мкг/мл) не проявил синергизма с цефокситином, линезолидом, клиндамицином, цiproфлоксацином (зоны задержки роста с пептидазой идентичны зонам в контроле) в отношении *S. aureus* 1380. M23 (1 мкг/мл) проявил синергизм с тигециклином, цефтазидимом, цефтазидимом/авибактамом, азтреонамом в отношении *K. pneumoniae* 3924. При добавлении белка M23 в концентрации 1 мкг/мл на плотную питательную среду, он полностью подавил рост *E. coli* 3906 (в контроле был плотный газон культуры), что не позволяет сделать вывод о наличии синергизма пептидазы и антибиотиков. Таким образом, МПК пептидазы M23 в

отношении *E. coli* 3906 находится в диапазоне 0,25 – 1 мкг/мл (по результатам собственной антимикробной активности белка и его синергизма).

Выводы. Выявлена собственная антибактериальная активность пептидазы M23 в отношении как типовых культур (*S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumonia* ATCC 13883, *E. coli* ATCC 25922), так и в отношении клинических изолятов (*S. aureus* 1243, *S. aureus* 1380). Обнаружен синергизм белка M23 с меропенемом (в отношении *K. pneumonia* 3924) и с цефокситином (в отношении *S. aureus* 1380) методом оценки кинетики отмирания. Однако, оценка синергизма пептидазы M23 диско-диффузионным методом показала отсутствие синергизма как с меропенемом в отношении *K. pneumoniae* 3924, так и цефокситина с *S. aureus* 1380. Данное явление требует дополнительного исследования. Также диско-диффузионным методом была обнаружена собственная антимикробная активность M23 в отношении *E. coli*.

Работа поддержана грантом РФН № 23-64-10029

Список использованных источников:

1. Savinova, O.S.; Glazunova, O.A.; Moiseenko, K.V.; Begunova, A.V.; Rozhkova, I.V.; Fedorova, T.V. Exoproteome Analysis of Antagonistic Interactions between the Probiotic Bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and Multidrug Resistant Strain of *Klebsiella pneumonia*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10999. <https://doi.org/10.3390/ijms222010999>
2. Wyres, K.L., Nguyen, T.N.T., Lam, M.M.C. *et al.* Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Med* **12**, 11 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0706-y>