

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕТАБИОТИКОВ ШТАММОВ РОДА *ENTEROCOCCUS* НА РОСТ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПНЕВМОНИЮ

© 2024 г. А. Исраелян*, @, Ц. Балабекян**, З. Саргсян***, Ф. Тхруни**

*Государственная некоммерческая организация “Арцахский научный центр”,
Тигран Мец, 26, Степанакерт, 2600 Нагорно-Карабахская Республика,

**Научно-производственный центр Армбиотехнологии НПП Национальной академии наук,
Гюрджян, 14, Ереван, 0056 Республика Армения

***Центр эпидемиологии и гигиены, Ар. Аракелян, 14, Степанакерт, 2600 Нагорно-Карабахская Республика

@E-mail: arevik_israelyan@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2022 г.

После доработки 07.03.2023 г.

Принята к публикации 12.07.2023 г.

Наибольшая антимикробная активность (100%) в отношении штаммов *Klebsiella pneumonia* и *Streptococcus pneumonia*, вызывающих пневмонию, показана при использовании белоксодержащих фракций (АМП), полученных после очистки культуральной жидкости (КЖ) при культивировании молочнокислых бактерий (МКБ) рода *Enterococcus*, выделенных из кисломолочных продуктов коз и ослиц, а наименьшая активность АМП — из КЖ штаммов, выделенных из кисломолочных продуктов коров (20–50%). Также выделены полисахариды штаммов рода *Enterococcus*, состоящие из молекул глюкозы и галактозы, обладающие антимикробной активностью. Разница в эффективности воздействия полисахаридов, выделенных из КЖ исследованных штаммов, зависит от концентрации полисахарида, источника выделения возбудителя, родовой и видовой принадлежности штамма, вызывающего пневмонию. Сделан вывод о перспективности использования некоторых метабитиков МКБ рода *Enterococcus* (пептидов и полисахаридов) в качестве биоингибиторов роста патогенных бактерий.

Ключевые слова: пневмония, антибиотики, полисахариды, антимикробные препараты

DOI: 10.31857/S1026347024010061, **EDN:** LSFEDO

В последние годы резистентность патогенных бактерий желудочно-кишечного тракта к антибиотикам рассматривается как серьезная проблема в связи с широким использованием традиционных антибиотиков при лечении заболеваний человека и животных.

Исследования последних лет по поиску новых антибиотиков привели к одной из самых многообещающих новых концепций — использованию метабитиков (пептидов, полисахаридов) в качестве антимикробных агентов. Противомикробные препараты, которые представляют собой встречающиеся в природе пептиды (белковоподобные вещества), обладают бактерицидным (убийцы клеток) или бактериостатическим (ингибиторы роста бактерий) действием. Различные исследователи показали, что молочнокислые бактерии (МКБ) обладают большим потенциалом для синтеза экзополисахаридов (ЭПС). ЭПС, производимые МКБ, привлекают все больше внимания,

главным образом из-за их преимуществ для здоровья, таких как иммунная стимуляция, антимутагенность, повышенное содержание антиоксидантов и противоопухолевая активность. Некоторые из них способствуют селективному росту молочнокислых бактерий и бифидобактерий, тем самым играя роль в микробиоте и иммунной системе хозяина (Dertli *et al.*, 2016; Jurášková. *et al.*, 2022).

Показано, что штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из молока различных домашних животных Республики Армения и Республики Арцах, имеют разную видовую и родовую принадлежность, а также разные физиологические, антибактериальные и пробиотические свойства (Bokulich *et al.*, 2015; Israelyan *et al.*, 2016). Проведенные исследования показали, что выделенные и изученные МКБ из южных районов Кавказа в основном представлены бактериями рода *Enterococcus* (Bokulich *et al.*, 2015).

Белоксодержащие фракции с антимикробной активностью (АМП) были получены методом гель-фильтрации супернатанта культуральной жидкости (КЖ) штаммов рода *Enterococcus*, выделенных из ферментированного молока. Исследования отдельных МКБ из ферментированного молока различных домашних животных (коров, овец, буйволиц, ослици и коз) показали, что пробиотические бактерии, выделенные из молока ослици, обладают высокой устойчивостью к антибиотикам (Israyelyan, 2018). Показано, что антимикробная активность штаммов рода *Enterococcus* обусловлена синтезом белковоподобных веществ и зависит от времени, температуры и состава питательной среды. Наибольшая антимикробная активность исследуемых штаммов проявляется при температуре выращивания 42 (Israyelyan *et al.*, 2015).

Целью данной работы явилось изучение выделенных штаммов МКБ рода *Enterococcus* с пробиотическими свойствами, синтезирующих разные метаболиты, на способность подавлять рост некоторых патогенных бактерий, вызывающих пневмонию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробные штаммы и питательные среды

В лаборатории технологии получения пробиотиков научно-производственного центра «Армбиотехнология» НАН РА из образцов молока ослици, отобранных в стерильных условиях из домашних хозяйств различных высокогорных районов Республики Армения и Арцаха, были выделены штаммы молочнокислых бактерий. Все штаммы депонированы в Центре микробного депозитария (МДЦ) НПЦ «Армбиотехнология» НАН. Штаммы МКБ выращивали на агаре и бульоне MRS Merck (Германия), ISO (Италия), HiMedia (Индия). Штаммы МКБ хранятся в замороженном виде при -20°C в бульоне MRS, содержащем 40% глицерина. Штаммы идентифицированы с помощью API-теста, секвенирования 16S РНК и RAPD PCR.

Приготовление инокулята и получение супернатанта культуральной жидкости

Единичные колонии выращивали в 5 мл бульона MRS (37, 48 ч), после чего переносили в колбу Эрленмейера на 100 мл, содержащую 50 мл бульона MRS, и инкубировали при 37 в течение 48 ч в термостате. По окончании роста культуры бульон центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин и полученный супернатант концентрировали в 5 раз. Антимикробные препараты получали из супернатанта культуральной жидкости после культивирования исследуемых штаммов методом ионообменной хроматографии (Aghajanyan *et al.*, 2015).

Определение антимикробной активности

Антимикробную активность полученных препаратов определяли согласно описанному методу (Parente *et al.*, 1995). Антибиотикорезистентность патогенных штаммов, выделенных от больных пациентов, определяли в Институте эпидемиологии, микробиологии и паразитологии МЗ РА и в Степанакертском центре гигиены и эпидемиологии. Для определения резистентности выделенных возбудителей к антибиотикам применяли метод со стандартными дисками антибиотиков (Oxoid, Великобритания) (Bauer *et al.*, 1966).

Выделение белковоподобных фракций с антимикробными свойствами супернатанта КЖ осуществляли методом гель-фильтрации. Для выделения полисахаридов был использован метод, описанный (Dertli *et al.*, 2016).

Статистический анализ

Использовались приложения Microsoft Office Excel 2010. Уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали антимикробную активность АМП различных штаммов рода *Enterococcus* в отношении антибиотикорезистентных бактерий. На рис. 1 показана антимикробная активность белоксодержащих фракций после гель-фильтрации супернатанта КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5 против *St. pneumoniae*.

Как видно из приведенных данных (табл. 1), эффективность ингибирования роста патогенных бактерий с помощью АМП разных штаммов *Enterococcus*, выделенных из ферментированного молока разных домашних животных, различается в зависимости от источника выделения МКБ. Наибольшая антимикробная активность (100%) в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* возникает при использовании АМП, полученных из КЖ после выращивания штаммов *Enterococcus*, выделенных из ферментированного козьего молока и молока ослици, а наименьшая активность АМП — из КЖ ферментированного коровьего молока (20–50%).

При выращивании штаммов ($N = 19$), выделенных из ферментированного молока ослици, в питательной среде MRS были отобраны штаммы с антимикробной активностью и выделены полисахариды. Используемый метод ВЭЖХ показал, что выделенные полисахариды штаммов *Ent. faecium* KE-5, *Ent. durans* KE-6, *Ent. faecium* KE-9 с антимикробной активностью состоят из молекул глюкозы и галактозы. Следует отметить, что не все полисахариды обладали способностью подавлять рост патогенных бактерий.

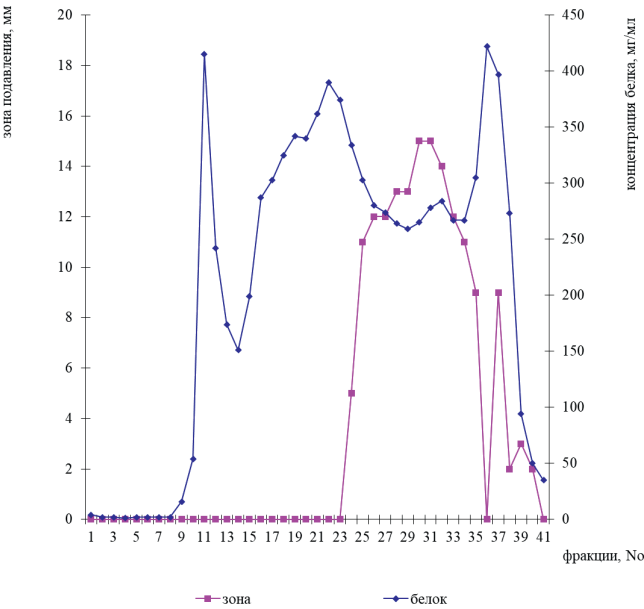


Рис. 1. Антимикробная активность белоксодержащих фракций, полученных после очистки супернатанта КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5 методом гель-фильтрации против *St. pneumonia*.

Полисахарид, выделенный из концентрата КЖ после выращивания штамма *Ent. faecium* KE-5, обладал высокой антимикробной активностью в отличие от других исследованных полисахаридов. Следует отметить, что снижение концентрации водного раствора полисахарида ниже 10% приводило к снижению антимикробной активности.

На рис. 2 представлены результаты подавления роста патогенных штаммов, выделенных из инфицированного глаза, полученным полисахаридом из КЖ штамма *Ent. faecium* KE-5, путем нанесения 20 мкл его 10–20%-го водного раствора на поверхность исследуемых патогенных бактерий на чашках Петри.

Как видно из данных (рис. 2) 10%-й водный раствор полисахаридов штамма *Ent. faecium* KE-5 ингибировал рост только двух штаммов патогенных бактерий *Kl. pneumonia* f1 1231 и *St. pneumonia* f1 400. Антимикробный препарат (АМП) и супернатант КЖ, содержащий разные метаболиты (белковоподобные фракции, полисахариды и органические кислоты), с разной эффективностью подавляют рост двух патогенных штаммов.

Эффективность использования препаратов, содержащих полисахарид, можно сравнить с 12 антибиотиками, ингибирующими рост используемых патогенных бактерий (рис. 3). Как видно из приведенных данных, используемые антибиотики (метод дисков) также с разной эффективностью подавляли рост используемых штаммов патогенных бактерий, выделенных из инфицированного глаза.

На рис. 4 представлены результаты ингибирования роста патогенных штаммов — возбудителей пневмонии, выделенных из мокроты зева больного при использовании полисахаридов и АМП. Ингибирование роста бактерий *St. pneumonia* было более эффективным, чем роста бактерий *Kl. pneumonia*. Используемые полисахариды ингибировали рост патогенных бактерий с той же эффективностью, что и некоторые антибиотики (рис. 5).

Таблица 1. Сравнительная антимикробная активность АМП из различных штаммов рода *Enterococcus* против антибиотикорезистентных бактерий (%)

Устойчивые к антибиотикам штаммы	N	Источник выделения МКБ из молока разных домашних животных										антибиотики N = 13
		корова				коза		ослица	буйво- лица	овца		
		<i>Ent. faecium</i> M22	<i>Ent. durans</i> M42	<i>Ent. durans</i> M44	<i>Ent. durans</i> P13	<i>Ent. faecium</i> KAP-1	<i>Ent. faecium</i> KA 3	<i>Ent. faecium</i> AE 225-9	<i>Ent. durans</i> AG 76	<i>Ent. faecalis</i> AV 222	<i>Ent. faecium</i> KV 15-1	
<i>Staph. aureus</i>	28	0.0	0.0	0.0	25.0	50.0	50.0	0.0	50.0	50.0	0.0	75.0
<i>Ps. aeruginosa</i>	21	50.0	0.0	50.0	58.0	100.0	100.0	100.0	50.0	50.0	50.0	60.0
<i>Pr. mirabilis</i>	23	50.0	20.0	50.0	29.0	50.0	100.0	100.0	0.0	0.0	50.0	85.0
<i>Kl. pneumonia</i>	8	0.0	50.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	83.0
<i>Pr. vulgaris</i>	7	0.0	0.0	0.0	0.0	33.0	66.0	66.0	33.0	33.0	66.0	66.0
<i>E. coli</i>	15	50.0	40.0	50.0	15.0	100.0	100.0	33.0	33.0	33.0	33.0	55.0

Примечание. АМП — антимикробные препараты, полученные после гель-фильтрации КЖ.

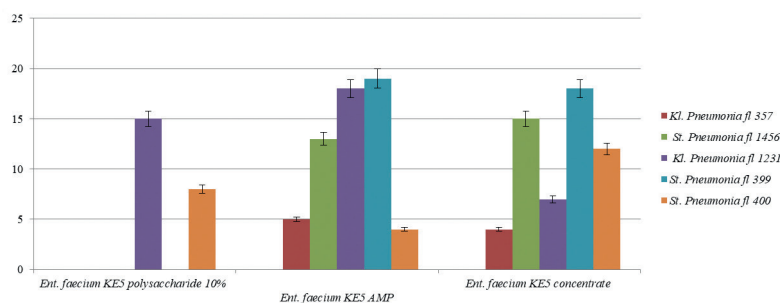


Рис. 2. Действие антимикробных препаратов в отношении штаммов, выделенных из инфицированных глаз, Ø мм.

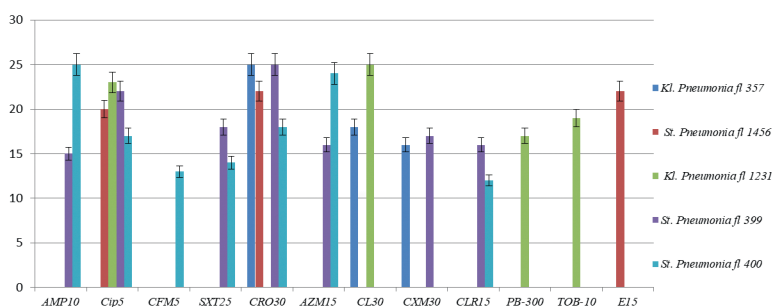


Рис. 3. Действие антибиотиков на штаммы, выделенные из инфицированных глаз, Ø мм.

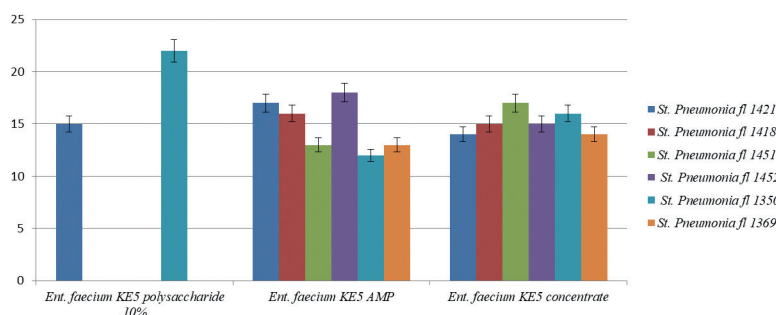


Рис. 4. Влияние противомикробных препаратов на рост бактерий, выделенных из зева, Ø мм.

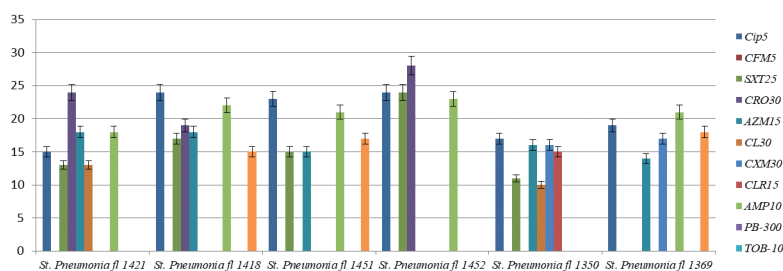


Рис. 5. Влияние антибиотиков на рост выделенных бактерий из зева, Ø мм.

Таблица 2. Сравнительная характеристика ингибирования роста штаммов *Kl. pneumonia* и *St. pneumonia*

Патогенные бактерии	N	Штамм	Полисахариды, %	%		
				У	П	Ч
<i>Kl. pneumonia</i>	9	Ent. faecium KE5	10	92.3	7.7	0
<i>St. pneumonia</i>	7	Ent. faecium KE5	20	68.4	10.5	21.1
<i>St. pneumonia</i>	5	Ent. sp. KE13	20	0	0	100
		Ent. sp. KE14	20	33.33	66.67	0

Примечание. У – устойчивый, П – промежуточный, Ч – чувствительный

Сравнительная характеристика ингибирования роста изученных патогенных штаммов *Kl. pneumonia* и *St. Pneumonia* приведена в табл. 2.

Как видно из приведенных данных, полисахариды (10%-й водный раствор), выделенные из КЖ разных штаммов, полученные из ферментированного молока ослиц, обладают разной антимикробной активностью против резистентных вариантов патогенных бактерий.

Таким образом, некоторые штаммы рода *Enterococcus* с пробиотическими свойствами, выделенные из молока ослиц, синтезируют белковоподобные вещества и полисахариды, состоящие из глюкозы и галактозы, и обладают разной антимикробной активностью в отношении исследуемых возбудителей пневмонии. Можно предположить, что высокая антимикробная активность штаммов может быть результатом суммарного действия продуктов метаболизма (полисахариды и белковоподобные вещества), образующихся при культивировании штамма *Ent. faecium* KE-5.

Ранее нами было показано, что очищенные пептиды из пробиотического штамма *Lactobacillus rhamnosus* BTK 2012 (BCN 1–1470 Da и BCN 2–670 Da) и *Lactobacillus acidophilus* 1991 (BCN-1100 Da) проявляют антимикробную активность в отношении грамотрицательных и грамположительных возбудителей, таких как *Salmonella sp.*, *Escherichi*

coli, *Proteus mirabilis*, *Pasteurella sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.*, а также ряда устойчивых к антибиотикам возбудителей. Эффективность различалась в зависимости от вида возбудителя, а также источника выделения (кровь, фекалии, моча и др.) (Tkhruni *et al.*, 2013, 2015). Влияние белка-бактериоцина (BCN 2–670 Da) КЖ *L. rhamnosus* BTK 2012 на рост полирезистентных патогенных бактерий, выделенных от инфицированных пациентов (различные источники, такие как кровь, фекалии, слюна и моча), представлено на рис. 6.

Сравнивая результаты действия полученных полисахаридов на рост бактерий *Klebsiella sp.*, видно, что разница в эффективности зависит от источника выделения возбудителей. Полученные данные согласуются с опубликованными данными ряда авторов (Yermolenko *et al.*, 2006; Karapetyan *et al.*, 2017). Различная эффективность ингибирования роста патогенных бактерий также может быть связана с различными механизмами действия веществ на клеточные мембраны разных патогенных бактерий.

ВЫВОДЫ

Таким образом, очевидна перспективность использования некоторых метаболитов (белковоподобных веществ, полисахаридов), полученных из пробиотического штамма рода *Enterococcus*

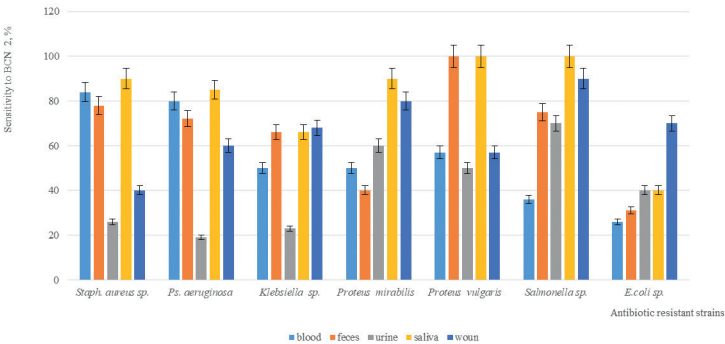


Рис. 6. Антимикробная активность BCN 2 (бактериоцин) в отношении некоторых патогенных бактерий человека.

против некоторых патогенных штаммов-возбудителей пневмонии. Эти метабитики могут использоваться для длительного применения против устойчивых к антибиотикам патогенов различной этиологии для профилактики или лечения инфекционных заболеваний. Работы в данном направлении продолжаются.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке исследовательского гранта Государственного комитета науки РА по проекту “23Т/АА-002”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Эта работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aghajanyan A.E., Tkhruni F.N., Hovhannisyan G.S., Eghyan K., Vardanyan A.A., Saghyan A.S. A method of producing and purification of bioinhibitors from culture liquids. Patent RA № 2925 A, 27.04. 2015.
- Bauer A.W., Kirby M.M., Sherris J.C., Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // *Am.J. Clin. Pathol.* 1966. V. 45. P. 493–496.
- Bokulich N., Amiranashvili L., Chitchyan K., Ghazanchyan N., Darbinyan K., Gagelidze N., Sadunishvili T., Goginyan V., Kvesitadze G., Torok T., Mills D. Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni // *Food Microbiology*. 2015. P. 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.018>
- Dertli E., Mercan E., Arici M., Yilmaz M.T., Sagdic O. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics // *LWT-Food Science and Technology*. 2016. V. 71. P. 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030>
- Israyelyan A., Karapetyan K., Tkhruni F., Arstamyany L., Balabekyan T. Sensitivity of different pathogens to biological antimicrobial agents // *European Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. V. 3. P. 61–66.
- Israyelyan A.L., Tkhruni F.N., Arstamyany L.A., Balabekyan T.R., Khachatryan T.V., Karapetyan K.J. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria isolated from several regions of Armenia and Nagorno Karabakh Republics // *Biolog. Journ. of Armenia, NAS RA*. 2016. P. 50–57.
- Israyelyan A.L. Investigation of lactic acid bacteria and their metabiotics isolated from milk of different domestic animals of Artsakh. Dis. Ph D. Yerevan, 2018. P. 116.
- Jurášková D., Ribeiro S., Silva C. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods*. 2022. V. 11. P. 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Karapetyan K., Tkhruni F., Israyelyan A., Yermolenko E., Verdyan A. Comparative characterization of endemic lactic acid bacteria of Enterococcus genus // *International Science of technology*. 2017. V. 6. P. 357–365.
- Parente E., Brienza C., Moles M., Riccardi A. A comparison of methods for measurement of bacteriocin activity // *Journal of Microbiology Methods*. 1995. Vol. 22. P. 95–108.
- Tkhruni F., Karapetyan K., Danova S., Dimova S., Karimpur F. Probiotic properties of endemic strains of lactic acid bacteria // *J. BioSci. Biotech.* 2013. V. 2. P. 1–6.
- Tkhruni F., Balabekyan Ts., Karapetyan K., Yakimovich N., Arstamyany L. Antibacterial activity of single cells in the population of lactic acid bacteria // *European Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2015. V. 3. P. 76–80.
- Yermolenko E., Chernish A., Aleshina G. Antagonistic activity of *Enterococcus faecium* L3 against different groups of pathogenic streptococci. *Streptococci New Insights Into and Old Enemy*. 2006. May. P. 363–366. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.11.030>

Effect of Some Metabiotics from Strains of the Genus Enterococcus on the Growth of Pathogenic Bacteria that Cause Pneumonia

A. Israyelyan^{1, #}, Ts. Balabekyan², Z. Sargsyan³, F. Tkhruni²

¹Artsakh Scientific Center State Non-Commercial Organization, Tigran Mets 26, Stepanakert, 2600 Nagorno Karabakh Republic

²Scientific and Production Center Armibiotechnology NSPO, National Academy of Science, Gyurjyan 14, Yerevan, 0056 Republic of Armenia,

³Center for Epidemiology and Hygiene, Ar. Arakelyan 14, Stepanakert, 2600 Nagorno Karabakh Republic

#e-mail: arevik_israelyan@mail.ru

It is shown that the highest antimicrobial activity (100%) against strains of *Kl. pneumonia* and *St. pneumonia* of strains causing pneumonia occurs when using protein-like fractions (AMP) obtained

from CL after cultivation of LAB of strains of the genus *Enterococcus* isolated from fermented milk of goats and donkeys, and the lowest activity of AMP from CL of strains isolated from fermented milk of cows (20–50%). It was shown that the isolated polysaccharides of strains of the genus *Enterococcus*, which have antimicrobial activity, consist of glucose and galactose molecules. The difference in the effectiveness of the influence of polysaccharides depends on the source of the isolated pathogens, depends on the concentration of the polysaccharide, the genus and species of the strain causing pneumonia. It is concluded that some metabiotics of the *Enterococcus* genus are promising for use as bioinhibitors of the growth of pathogenic bacteria.

Keywords: pneumonia, antibiotics, polysaccharides, antimicrobials.