

# Индукция и стабилизация антибактериальной активности у пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534

\*О. В. ЕФРЕМЕНКОВА<sup>1</sup>, И. А. МАЛАНИЧЕВА<sup>1</sup>, Б. Ф. ВАСИЛЬЕВА<sup>1</sup>,  
Т. А. ЕФИМЕНКО<sup>1</sup>, А. А. ГЛУХОВА<sup>1</sup>, О. В. КИСИЛЬ<sup>1</sup>, М. В. ДЕМЬЯНКОВА<sup>1,2</sup>,  
Х. С. СЕМИЗАЕВ<sup>1</sup>, Н. И. ГАБРИЭЛЯН<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

## Induction and Stabilization of Antibacterial Activity in a *Bacillus subtilis* 534 Probiotic Strain

\*OLGA V. EFREMENKOVA<sup>1</sup>, IRINA A. MALANICHEVA<sup>1</sup>, BASILYA F. VASILEVA<sup>1</sup>,  
TATIANA A. EFIMENKO<sup>1</sup>, ALLA A. GLUKHOVA<sup>1</sup>, OLGA V. KISIL<sup>1</sup>,  
MARIIA V. DEMIANKOVA<sup>1,2</sup>, HUSSEIN S. SEMIZAEV<sup>1</sup>, NINA I. GABRIELIAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Centre of Transplantation and Artificial Organs named after academician V. I. Shumakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

### Резюме

В основе лекарственного средства пробиотика споробактерина лежит штамм *Bacillus subtilis* 534, для которого было показано антимикробное действие в отношении многих бактерий как коллекционных штаммов, так и антибиотикорезистентных форм клинических изолятов патогенных бактерий и грибов. Рассматривая данный штамм в качестве продуцента антибиотиков, была проведена ступенчатая мутагенная обработка с целью получения варианта, стабильно на высоком уровне проявляющего определённую антибиотическую активность. За три ступени мутагенной обработки и отбора получен мутантный вариант, эффективно подавляющий рост патогенных стафилококков, в том числе метициллинорезистентного стафилококка (MRSA).

**Ключевые слова:** антибиотики; антибиотикорезистентность; пробиотики; споробактерин; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*

**Для цитирования:** Ефременкова О. В., Маланичева И. А., Васильева Б. Ф., Ефименко Т. А., Глухова А. А., Кисиль О. В., Демьянкова М. В., Семизаев Х. С., Габриэлян Н. И. Индукция и стабилизация антибактериальной активности у пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 9–10: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-4-10>.

### Abstract

Medicinal probiotic Sporobacterin is based on the *Bacillus subtilis* 534 strain, which has been shown to have antimicrobial activity against many bacteria, both the collection strains and the antibiotic-resistant forms of clinical isolates of pathogenic bacteria and fungi. Considering this strain as an antibiotic producer, a step-by-step mutagenic treatment was carried out in order to obtain a variant that consistently exhibits a certain high-level antibiotic activity. A mutant variant was obtained during the three stages of mutagenic treatment and selection; it effectively suppresses the growth of pathogenic staphylococci, including methicillin-resistant staphylococcus (MRSA).

**Keywords:** antibiotics; antibiotic resistance; probiotics; sporobacterin; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*

**For citation:** Efremenkova O. V., Malanicheva I. A., Vasileva B. F., Efimenko T. A., Glukhova A. A., Kisil O. V., Demiankova M. V., Semizayev H. S., Gabrielyan N. I. Induction and stabilization of antibacterial activity in a *Bacillus subtilis* 534 probiotic strain. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 4–10. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-4-10>.

## Введение

Пробиотики — это лекарственные средства, в основе которых лежат живые микроорганизмы,

способствующие нормализации микробиоты человека. Термин «пробиотик» также применяется непосредственно к самим пробиотическим мик-

© Коллектив авторов, 2022

\*Адрес для корреспонденции: ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1. НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, г. Москва, Россия, 119021. E-mail: [ovefr@yandex.ru](mailto:ovefr@yandex.ru)

© Team of Authors, 2022

\*Correspondence to: 11 bld 1 Bolshaya Pirogovskaya Street, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia. E-mail: [ovefr@yandex.ru](mailto:ovefr@yandex.ru)

роорганизмам. Действие пробиотиков носит многофакторный характер и одним из свойств пробиотиков является образование антибиотических веществ, способствующих восстановлению баланса микробиоты кишечника. Ценным свойством многих пробиотиков является отсутствие токсичности [1].

К пробиотическим микроорганизмам, применяемым в качестве лекарственных средств для нормализации микробиоты, преимущественно относятся *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Эти бактерии являются естественными компонентами кишечной микробиоты человека, а их применение способствует восстановлению баланса микробиоты, в частности после перенесённой антибиотикотерапии. Сенная палочка (*Bacillus subtilis*) также используется в качестве пробиотика [2–4]. Большинство бактерий рода *Bacillus*, включая *B. subtilis*, широко распространены в окружающей среде и не опасны для человека. Их обнаруживают в почве, воде, воздухе и пищевых продуктах, и, как следствие, они постоянно попадают в организм человека. Количество бацилл в кишечнике может достигать  $10^7$  КОЕ/г, что сравнимо с аналогичным показателем у *Lactobacillus*. Хотя *B. subtilis* относится к транзиторным пробиотикам, то есть временно присутствующим в организме человека, ряд исследователей рассматривают бактерии этого вида как один из доминирующих компонентов нормальной микрофлоры кишечника [2–4].

Механизм пробиотического действия бактерий может быть связан с синтезом противомикробных веществ, усилением неспецифического и специфического иммунитета, стимуляцией роста нормальной микрофлоры кишечника и выделением пищеварительных ферментов. У *B. subtilis* описано более ста антибиотиков, активных в отношении широкого спектра патогенных бактерий, вирусов и грибов. Эти соединения имеют различную химическую природу, в том числе описаны циклические липопептиды, поли- и олигопептиды, белки бактериоцины, разнообразие которых обуславливает широкий спектр активности антибиотиков данного продуцента [5–10]. Отмечено ценное свойство некоторых исследованных пробиотических штаммов *B. subtilis* — они обладают избирательным действием, вызывая гибель и подавление роста и размножения патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, но нейтральны по отношению к микробиоте кишечника (лактобактериям, бифидобактериям, бактероидам и др.) [11].

Штамм *B. subtilis* 534 является основой пробиотического препарата споробактерина. Этот препарат представляет собой суспензию штамма *B. subtilis* 534 в 7% водном растворе хлорида натрия [12]. В России споробактерин успешно ис-

пользуется в течение последних тридцати лет, в частности, для профилактики и лечения послеоперационных бактериальных и грибковых инфекций в высокотехнологичной хирургии [12–14].

На сегодняшний день опубликованы результаты многолетних клинических и лабораторных исследований, согласно которым применение споробактерина в технологии раннего послеоперационного ведения пациентов с кардиохирургическим и трансплантационным профилями открывает возможности для оптимизации клинического состояния пациентов, а также значительно сокращает продолжительность курсов антибактериальной терапии [15–18]. Ранее нами было показано, что штамм *B. subtilis* 534 образует не менее 4 антибиотических соединений или групп соединений с разным спектром антимикробного действия, из которых одно предположительно является бактериоцином, а другое соединение, проявляющее антимикотическую активность, предположительно является триеном. Образующие соединения ценны тем, что преодолевают антибиотикорезистентность как тест-штаммов, так и клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *S. capitis* sbsp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Prototheca* sp., *Trichosporon* sp. [19–22].

В связи с распространением антибиотикорезистентности в популяциях патогенных бактерий большое значение приобретает изыскание новых эффективных природных антибиотиков. В данной работе мы рассматривали штамм *B. subtilis* 534 в качестве продуцента антибиотиков. Поскольку проявление антимикробной активности у штамма 534 зависит от многих факторов, нестабильно и трудно поддаётся биотехнологическому регулированию, конкретной задачей была разработка условий для стабилизации процесса биосинтеза и повышения продуктивности образующих антимикробных соединений.

## Материал и методы

**Объекты исследования.** Основным объектом исследования являлся штамм *Bacillus subtilis* 534, депонированный в Коллекцию культур микроорганизмов ФГБНУ «НИИНА» под номером ИНА 01122, а также полученные из него мутанты. Для определения антибиотической активности использовали следующие коллекционные тест-штаммы: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177 (уровень устойчивости к гликопептидным антибиотикам группы ванкомицина > 400 мкг/мл), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (метициллинорезистентный штамм — MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259. Клинические изоляты *S. capitis* sbsp. *urealyticus* 1133 и *S. epidermidis* 2624 выделены от контаминированных пациентов Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова.

**Таблица 1.** Значения антимикробной активности наиболее перспективных мутантов *B.subtilis* 534, отобранных после первой ступени обработки мутагеном

**Table 1.** Antimicrobial activity values of the most promising *B.subtilis* 534 mutants selected after the first stage of mutagen treatment

Исходный штамм 534 и его мутантные варианты	Зоны отсутствия роста тест-штаммов, мм				
	<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>L.mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.cerevisiae</i> RIA 259
534 (контроль)	16±1,3	0	0	0	(30±4,1)
534 (контроль)	18±1,9	0	0	0	(27±2,9)
534-17	16±1,7	0	0	18±1,6	(30±3,1)
534-18	18±1,6	0	17±1,2	19±1,9	17 (34±2,7)*
534-25	17±1,7	0	19±1,4	16±1,3	14 (28±2,1)*
534-30	26±2,3	0	0	(17±1,7)	(30±3,8)
534-31	26±1,7	0	0	(17±1,3)	(30±2,7)
534-35	26±1,7	0	0	(20±2,1)	(>30±4,2)

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: в скобках указаны зоны угнетения роста тест-штамма; \* — в случае двойных зон, то есть зоны подавления роста и большей по диаметру зоны угнетения роста, в скобках указана зона угнетения роста.

**Note.** Here and in Table 2: zones of growth inhibition of the test strain are indicated in brackets; \* — in the case of double zones, i. e. a zone of growth inhibition and a larger zone of growth inhibition, the zone of growth inhibition is indicated in brackets.

**Условия культивирования.** Все микроорганизмы выращивали на модифицированной среде №2 Гаузе следующего состава (%): глюкоза — 1, пептон — 0,5, триптон — 0,3, хлорид натрия — 0,5, агар — 2,0, вода водопроводная, pH 7,2–7,4. Тест-штаммы выращивали в течение 1 суток при температуре 37°C, исключение составляли *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 и *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259, которые выращивали при 28°C.

В условиях глубокого культивирования исходный пробиотический штамм *B.subtilis* 534 и полученные из него мутанты выращивали в колбах Эрленмейера на жидкой модифицированной среде №2 Гаузе (без агара) на качалке 200 об/мин при температуре 28°C. Объем среды составлял от 50 до 300 мл при объеме колбы 750 мл. Засев осуществляли споровой суспензией из расчета 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup> или 10<sup>6</sup> спор на 1 мл питательной среды. Колбы инкубировали в условиях аэрирования на качалке с 200 об/мин при 28°C в течение 42 часов.

**Химический мутагенез штамма *B.subtilis* 534.** Суспензию спор штамма *B.subtilis* 534 обрабатывали 1% водным раствором диметилмочевины (ДММ) в течение 0,5, 1, 2 и 4 ч с последующим высевом на среду №2 Гаузе. Отдельные колонии как основного типа, так и с морфологическими отличиями, отсеивали и в дальнейшем определяли их уровень продуктивности и антимикробный спектр в культуральной жидкости.

**Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК мутантных штаммов *B.subtilis*.** Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК мутантов *B.subtilis* анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В работе использовали универсальные праймеры 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1492r (TACGGYTACCTGTAC-GACTT). Режим проведения ПЦР: (1) 3 мин при 95°C, (2) 25 циклов с чередованием температурных интервалов 30 с — при 95°C, 30 с — при 51°C, 90 с — при 72°C, (3) 7 мин — при 72°C. Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле при напряженности электрического поля 5 В/см. ДНК секвенировали на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США). Для определения последовательностей использовали базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) и Ribosomal Database Project (<<http://www.cme.msu.edu>>).

**Определение антибиотической активности осуществляли методом диффузии в агар.** Для этого в лунки диаметром 9 мм в агаровой среде с высевом газона тест-штамма вносили по 100 мкл образцов культуральной жидкости. Через сутки инкубирования определяли диаметры зон задержки роста бактерий или дрожжей вокруг лунок, являющиеся показателем антибиотической активности исследуемых образцов.

## Результаты и обсуждение

Для стабилизации и повышения уровня биосинтеза антимикробных соединений была получена серия мутантных вариантов из штамма *B.subtilis* 534 методом ступенчатого химического мутагенеза. На первой ступени мутагенеза было установлено, что при титре исходной суспензии 1,2×10<sup>9</sup> выживаемость клеток уменьшалась в зависимости от времени экспозиции мутагеном и составляла 1,2×10<sup>5</sup> и 1,6×10<sup>3</sup> жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии через 2 и 4 ч обработки, соответственно. При этих экспозициях были отобраны наиболее перспективные варианты — продуценты антимикробных веществ. Среди выросших колоний, наряду с колониями основного типа, наблюдались следующие морфологические отличия от исходного штамма *B.subtilis* 534: больший размер колонии, карликовая колония, интенсивность окраски колонии, матовость поверхности, форма края колонии, складчатость. После первой стадии мутагенеза с учётом морфологических отличий, отобрано 44 клона для определения антимикробной активности.

Для осуществления биосинтеза мутантными штаммами были выбраны условия, ранее определённые как оптимальные для биосинтеза антимикробных веществ исходным штаммом 534: объем среды в колбах 200 мл, нагрузка посевного материала 10<sup>7</sup> клеток/мл среды, длительность культивирования 42 ч. Анализ антимикробной активности в культуральной жидкости проводили в отношении пяти тест-штаммов, уделяя основное внимание активности против устойчивых тест-штаммов (табл. 1).

Различия в характере проявляемой антимикробной активности у мутантов были видны уже на первой стадии анализа культуральной жидкости. Например, культуральная жидкость мутант-



**Таблица 2.** Значения антимикробной активности культуральной жидкости мутантного штамма *B.subtilis* 534-25 при разной нагрузке посевного материала

**Table 2.** Values of culture liquid antimicrobial activity of the mutant strain *B.subtilis* 534-25 at different inoculum loads

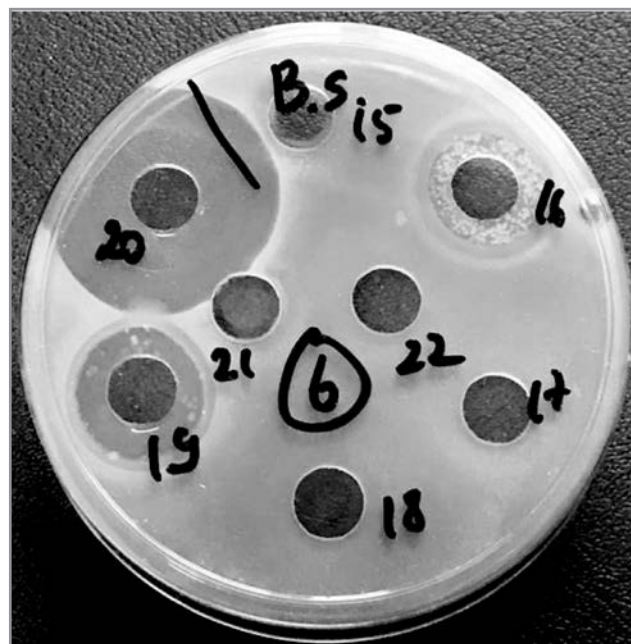
Нагрузка посевного материала (клеток/мл среды)	Диаметр зон задержки роста (мм)		
	<i>S.aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	<i>L.mesenteroides</i> ВКПМ В-4177	<i>S.cerevisiae</i> RIA 259
$10^8$	22±1,6 21±1,7	0 0	0 (22±2,1) 0 (20±1,7)
$10^7$	(20±1,7) (22±1,4)	11±0,7 12±1,1	11±0,4 (20±1,5) 12±0,9 (22±2,1)
$10^6$	(18±0,9) (20±1,1)	15±0,7 16±1,4	14±0,5 (20±1,6) 15±0,7 (20±1,9)

ных вариантов 16, 19 и 20 образует вокруг лунок зону диффузии антимикробных соединений, подавляющих рост тест-штамма *B.subtilis* ATCC 6633 (рисунок). На рисунке видно, что в популяции тест-штамма ATCC 6633 есть устойчивые клетки к антимикробному веществу варианта 19, рост которых виден в виде нескольких колоний на фоне зоны подавления роста, большое количество выросших устойчивых колоний вокруг лунки варианта 16 и отсутствие устойчивых форм вокруг лунки варианта 20; также видна стимуляция роста тест-штамма у перечисленных мутантов, которая проявляется в виде более плотного роста *B.subtilis* ATCC 6633 на границе зоны подавления роста (см. рисунок). Разная резистентность тест-штамма свидетельствует о биосинтезе данными мутантами разных антимикробных веществ.

Показатели антимикробной активности шести наиболее перспективных мутантов *B.subtilis* 534, полученных на первой стадии обработки ДММ, обобщены в табл. 1. В отличие от контрольных вариантов родительского штамма, мутантные варианты 30, 31 и 35 демонстрируют повышенную активность в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), в то время как штаммы 18 и 25 подавляют рост ванкомицино-резистентного штамма *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177; варианты 17, 18 и 25 также проявляют активность в отношении грамотрицательной бактерии (*E.coli* ATCC 25922); варианты 18 и 25 отличаются от контрольных вариантов родительского штамма *B.subtilis* 534 и от других мутантов антимикотической активностью (в отношении пекарных дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259) (табл. 1).

Оптимальные показатели антимикробной активности продемонстрировал мутантный штамм *B.subtilis* 534-25 («534-25»), он был проверен в общей сложности 5 раз и после подтверждения стабильности биосинтеза выбран для второй стадии мутагенеза.

Была проанализирована антимикробная активность культуральной жидкости мутантного варианта 534-25 при разной нагрузке посевного материала в отношении тест-штамов *S.aureus* ИНА 00761, *S.cerevisiae* RIA 259 и *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 в условиях погружённого культивирования (табл. 2). Полученные результаты поз-



**Зоны подавления роста тест-штамма *B.subtilis* ATCC 6633 культуральной жидкостью мутантных вариантов штамма *B.subtilis* 534, полученных на первой ступени мутагенеза.**

**Zones of growth inhibition of the test strain *B.subtilis* ATCC 6633 by the culture liquid of mutant variants of the *B.subtilis* 534 strain obtained at the first stage of mutagenesis.**

воляют предположить, что штамм 534-25 образует не менее 3 антибиотиков, образующихся поразному в ответ на разную нагрузку:

1. Уровень биосинтеза антибиотика (или антибиотиков), подавляющего рост MRSA, выше при наибольшей нагрузке посевного материала ( $10^8$  клеток/мл среды).

2. Уровень биосинтеза антибиотика (или антибиотиков), подавляющего рост *L.mesenteroides* ВКПМ В-4177 и дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259, выше при снижении нагрузки посевного материала.

На второй и третьей стадии мутагенеза отбор мутантов проводили по уровню антимикробной активности культуральной жидкости, проявляемой в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA). На второй стадии мутагенеза было отсеяно 56 клонов, из которых мутантный вариант 534-25-21 превысил родительский мутантный вариант 534-25 на

**Таблица 3.** Значения антимикробной активности культуральной жидкости мутантного штамма *B.subtilis* 534-25-21-72 в отношении клинических изолятов *Staphylococcus* spp.

**Table 3.** The values of culture liquid antimicrobial activity of the mutant strain *B.subtilis* 534-25-21-72 against clinical isolates of *Staphylococcus* spp.

Клинические изоляты	Устойчивость клинических изолятов в отношении медицинских антибиотиков (всего использовано 22 антибиотика)	Зоны подавления роста под действием мутанта 534-25-21-72 (мм)
<i>S.capitis</i> sbsp. <i>urealyticus</i> 1133	2 (пенициллин и ампициллин)	22-24
<i>S.epidermidis</i> 2624	15 (ампициллин, амикацин, азтреонам, хлорамфеникол, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, имипенем, левофлоксацин, меропенем, моксифлоксацин, тобрамицин, оксациллин, пенициллин, ампициллин/сульбактам, триметоприм/сульфаметоксазол, тетрациклин)	26-28

25%. Этот мутантный вариант также отличается от родительского по антимикробному спектру: из тест-бактерий активность проявляется только в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), активность в отношении дрожжей *S.cerevisiae* RIA 259 проявляется в виде незначительной зоны угнетения роста (диаметр не более 16 мм).

На третьей стадии мутагенеза из варианта 534-25-21 было отсееено 74 клона. Главной задачей данной стадии было повышение уровня биосинтеза вещества (или веществ), подавляющих рост MRSA. По результатам анализа антимикробной активности был отобран мутант 534-25-21-72, у которого активность проявлялась только в отношении *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA), и зоны задержки роста составляли 25–28 мм при предварительном разведении культуральной жидкости в 100 раз.

Помимо коллекционного тест-штамма *S.aureus* ИНА 00761 (MRSA) активность культуральной жидкости была дополнительно проверена в отношении двух клинических изолятов, устойчивых к ряду антибиотиков медицинского назначения (табл. 3).

Поскольку у бацилл не так много отличительных морфологических признаков, для подтверждения принадлежности мутантных вариантов 534-25, 534-25-21 и 534-25-21-72 к виду *B.subtilis* была проанализирована последовательность гена 16S rRNA и сопоставлена с последовательностью исходного штамма *B.subtilis* 534. Идентичность последовательности данного гена у исходного штамма и всех трёх мутантов подтверждает, что они происходят от штамма *B.subtilis* 534, а вызванные мутации не затрагивают ген 16S rRNA.

## Обсуждение

Поиск новых природных антибиотиков основанно проводить среди микроорганизмов, являющихся компонентами сложных микробных сообществ, в которых признак антибиотикообразования выработан и закреплён эволюционно, поскольку он имеет важное значение в межвидовой конкуренции. К числу таких сообществ относится микробиота кишечника, в которой некото-

рые бактерии способны существовать длительное время или на постоянной основе, в том числе за счёт биосинтеза антибиотиков. К числу таких бактерий относится пробиотический штамм *B.subtilis* 534. Показано, что для любого штамма вида *B.subtilis* не менее 4–5% его генома предназначено для производства противомикробных соединений [6]. Ранее было показано, что штамм 534 проявляет антибиотическое действие в отношении широкого спектра бактерий и грибов. Сложности в разработке биотехнологий стабильного продуцирования соединений определённого антибиотического действия затрудняли работу по химическому изучению данного продуцента.

В настоящей работе стабилизировать биосинтез и также повысить уровень продуктивности удалось за счёт химического мутагенеза. Начиная со второй ступени мутагенеза, нами проводился отбор по активности в отношении резистентного стафилококка, однако возможно получение продуцента при отборе на ванкомицинорезистентный штамм или штамм дрожжей, для разработки антибиотиков, преодолевающих антибиотикорезистентность или обладающих антимикотическим действием, соответственно. Данный подход с применением химического мутагенеза не столько для повышения продуктивности, сколько для стабилизации процесса биосинтеза, рассматриваем как перспективный метод для разработки технологии получения антибиотиков бактериального происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (соглашение №075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF----193021X0012).

## Дополнительная информация

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest related to the publication of this article.

## Литература/References

1. Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 2161–2171. doi: 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004.
2. Скрыпник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие антибиотики в клинической практике. Современная гастроэнтерология. 2009; 3: 81–90. [Skrypnik I.N., Maslova A.S. Modern spore-forming probiotics in clinical practice. *Sovremennaya Gastroenterologiya.* 2009; 47 (3): 81–90. (in Russian)]
3. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. Химическая и биологическая безопасность. 2007; 2–3: 20–41. [Pokhilenko V.D., Pereygin V.V. Probiotics based on spore-forming bacteria and their safety. *Khim Biol Bezop.* 2007; 2–3: 20–41. (in Russian)]
4. Саустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*. Актуальная инфектология. 2016; 2 (11): 35–44. [Saust'yanenko A.V. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Aktual'naya Infektologiya.* 2016; 2 (11): 35–44. (in Russian)]
5. Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *Am J Biochem Biotech.* 2012; 8: 38–43. doi: 10.3844/AJBBS2012.38.43.
6. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005; 56 (4): 845–857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
7. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 95–105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
8. Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Nahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015; 61: 93–103. doi: 10.1139/cjm-2014-0613.
9. Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I., Malanicheva I.A., Demiankova M.V., Efimenko T.A., Rogozhin E.A., Sharapchenko S.O., Krupeniy T.V., Davydov D., Kornilov M. Antibiotic properties of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 534. *International Archives of Medical Microbiology.* 2019; 2: 008. <https://doi.org/10.23937/10008>.
10. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. In: Vilas A.M. (ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Formatex, Badajoz, Spain. 2011; 1102–1111.
11. Тагиева С.А., Тахраманова Ф.Х. Преимущества применения бактерицидных препаратов по сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных. (Обзор). Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2020; 4: 122–128. [Tagieva S.A., Gakhramanova F.Kh. Advantages of the use of bacteriocins compared to chemical antibiotics for the treatment of infections in human and animals. (Review). *Vestnik Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmaciya.* 2020; (4): 122–128. (in Russian)]
12. Никитенко В.И., Полякова В.С., Никитенко М.В., Симоненко Е.В., Бородин А.В., Копылов В.А., Фомина М.В. Препарат споробактерин. Новые данные о механизме действия этого и других живых бактериальных препаратов. Научный вестник Тюменской медицинской академии. 2001; 2: 70–72. [Nikitenko V.I., Polyakova V.S., Nikitenko M.V., Simonenko E.V., Borodin A.V., Kopylov V.A., Fomina M.V. Preparat sporobakterin. Novye dannye o mekhanizme dejstviya etogo i drugikh zhivykh bakterial'nykh preparatov. *Nauchnyy vestnik Tyumenskoj medicinskoj akademii.* 2001; 2: 70–72. (in Russian)]
13. Патент СССР на изобретение № 1723116 А1/ 30.03.1992. Бюл. № 12. Никитенко В.И., Никитенко И.К. Бактериальный штамм *Bacillus subtilis*, используемый для получения препарата для профилактики и лечения воспалительных процессов и аллергических заболеваний. [Patent SU № 1723116 А1/ 30.03.1992. Byul. № 12. Nikitenko V.I., Nikitenko I.K. Bakterial'nyj shtamm *Bacillus subtilis*, ispol'zuemyj dlya polucheniya preparata dlya profilaktiki i lecheniya vospalitel'nyh processov i allergicheskikh zaboolevanij. (in Russian)]. Доступно по: <https://patent.ru/patent/SU1723116A1>. Ссылка активна на 20.09.2022.
14. Патент РФ на изобретение № 2217154С2/ 27.11.2003 Бюл. № 33. Никитенко М.В., Никитенко В.И. Лекарственный препарат Споробактерин жидкий. [Patent RU № 2217154С2/ 27.11.2003 Byul. № 33. Nikitenko M.V., Nikitenko V.I. Lekarstvennyj preparat Sporobakterin zhidkij (in Russian)]. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2217154C2/ru>. Ссылка активна на 20.09.2022.
15. Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Горская Е.М., Спирина Т.С., Осипова И.Г. Антагонизм *in vitro* споробактерина в отношении нозокомиальных штаммов бактерий. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2008; 6: 12–18. [Gabrielyan N.I., Davydov D.S., Gorskaya E.M., Spirina T.S., Osipova I.G. *In vitro* antagonism of sporobacterin against nosocomial strains of microbes. *Vestnik Transplantologii i Iskusstvennyh Organov.* 2008; 6: 12–18. (in Russian)]
16. Казаков Э.Н., Габриэлян Н.И., Сенченко О.Р., Петраков К.В., Арефьева Л.И., Воронин Е.М. К вопросу о профилактике инфекционных осложнений после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения. Российский медицинский журнал. 2013; 2: 13–16. [Kazakov E.N., Gabrielyan N.I., Senchenko O.R., Petrakov K.V., Arefeva L.I., Voronin E.M. The clinical and economic issues of patient management after cardiac-surgery operations. *Rossiiskij Medicinskij Zhurnal.* 2013; 2: 13–16. (in Russian)]
17. Третьяков А.А., Стадников А.А., Вальшев А.В. Клинико-экспериментальное обоснование применения споробактерина в комплексной терапии при механической желтухе. Анналы травматологии и ортопедии. 2001; 2: 42–48. [Tretyakov A.A., Stadnikov A.A., Valyshev A.V. Kliniko-eksperimental'noe obosnovanie primeneniya sporobakterina v kompleksnoj terapii pri mekhanicheskoj zheltuhe. *Annaly Travmatologii i Ortopedii.* 2001; 2: 42–48. (in Russian)]
18. Сорокина В.О., Минасов Б.Ш., Попова О.В., Попов О.С. Применение споробактерина в лечении пациентов с ожоговыми ранами. Медицинский вестник Башкортостана. 2013; 8 (6): 106–108. [Sorokina V.O., Minasov B.Sh., Popova O.V., Popov O.S. Sporobacterin in treatment of patients with burn wounds. *Medicinskij Vestnik Bashkortostana.* 2013; 8 (6): 106–108. (in Russian)]
19. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Крупенин Т.В., Зенкова В.А., Ефименко Т.А., Маланicheva И.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С. Оценка антимикробной активности бациллярного пробиотика *Bacillus subtilis* (штамм 534). Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016; 1: 41–47. [Gabrielyan N.I., Gorskaya E.M., Krupeniy T.V., Zenkova V.A., Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Sumarukova I.G., Efremenkova O.V., Evlashkina V.F., Davydov D.S. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacterial probiotic *Bacillus subtilis* 534. *Epidemiologiya i Infekcionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy.* 2016; 1: 41–47. (in Russian)]
20. Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И., Маланicheva И.А., Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Удалова В.В., Глухова А.А., Рогожин Е.А., Алферова В.А., Коришун В.А., Кубанова М.Х., Драбкина И.В., Крупенин Т.В. Антибиотическая активность пробиотического штамма *Bacillus subtilis* 534 в отношении клинических изолятов *Acinetobacter baumannii*. Антибиотики и химиотер. 2016; 61 (9–10): 3–7. [Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I., Malanicheva I.A., Efimenko T.A., Terekhova L.P., Udalova V.V., Gluhova A.A., Rogozhin E.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Kubanova M.H., Drabkina I.V., Krupeniy T.V. Antibiotic activity of probiotic strain *Bacillus subtilis* 534 against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotiki i Khimioter.* 2016; 61 (9–10): 3–7. (in Russian)]
21. Габриэлян Н.И., Драбкина И.В., Крупенин Т.В., Демьянкова М.В., Маланicheva И.А., Васильева Б.Ф., Ефименко Т.А., Сумарукова И.Г., Глухова А.А., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Удалова В.В., Алферова В.А., Коришун В.А., Ефременкова О.В. Антимикотическая активность штамма *Bacillus subtilis* 534 — основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина. Антибиотики и химиотер. 2017; 62 (11–12): 7–11. [Gabrielyan N.I., Drabkina I.V., Krupeniy T.V., Dem'yankova M.V., Malanicheva I.A., Vasil'eva B.F., Efimenko T.A., Sumarukova I.G., Gluhova A.A., Bojkova YU.V., Malkina N.D., Udalova V.V., Alfyorova V.A., Korshun V.A., Efremenkova O.V. Antimycotic activity of the *Bacillus subtilis* 534 strain — foundations of probiotic sporobacterin. *Antibiotiki i Khimioter.* 2017; 62 (11–12): 7–11. (in Russian)]
22. Маланicheva И.А., Кубанова М.Х., Алферова В.А., Коришун В.А., Драбкина И.В., Крупенин Т.В., Ефременкова О.В., Габриэлян Н.И. Антимикробные свойства штамма *Bacillus subtilis* 534 — основы лекарственного препарата пробиотика споробактерина. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова, 2017, 13 (4): 59–65. [Malanicheva I.A., Kubanova M.H., Alferova V.A., Korshun V.A., Drabkina I.V., Krupeniy T.V., Efremenkova O.V., Gabrielyan N.I. Antimikrobnnye svoystva shtamma *Bacillus subtilis* 534 — osnovy lekarstvennogo preparata probiotika sporobakterina. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Himicheskoy Biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova,* 2017, 13 (4): 59–65. (in Russian)]



## Информация об авторах

*Ефременкова Ольга Владимировна* — к. б. н., заведующая сектором поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3131-1031. ResearcherID: AAB-3284-2022. eLIBRARY SPIN-код: 9342-5542. Scopus Author ID: 6603882213

*Маланичева Ирина Алексеевна* — к. б. н., старший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7623-6146. ResearcherID: AAD-1828-2022. eLIBRARY SPIN-код: 8314-0809. Scopus Author ID: 6602339599

*Васильева Базиля Фейзуловна* — научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9077-1965. Scopus Author ID: 57204061590

*Ефименко Татьяна Александровна* — к. б. н., старший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-9632-6854. ResearcherID: A-5085-2019. eLIBRARY SPIN-код: 8821-9617. Scopus Author ID: 56403188800

*Глухова Алла Алексеевна* — научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0561-4709. Scopus Author ID: 57192180120

*Кисиль Ольга Валерьевна* — к. х. н., ученый секретарь Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-4799-1318. ResearcherID: G-6580-2017. eLIBRARY SPIN-код: 1153-8414. Scopus Author ID: 36770374700

*Демьянкова Мария Владимировна* — младший научный сотрудник сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-0085-1668. ResearcherID: AAT-2514-2021. eLIBRARY SPIN-код: 2460-8399. Scopus Author ID: 57204364679

*Семизаев Хусейн Султахметович* — инженер сектора поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва, Россия

*Габриэлян Нина Индзаровна* — д. м. н., заведующая отделом эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений Национального медицинского исследовательского центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В. И. Шумакова, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-1941-8311. eLIBRARY SPIN-код: 3334-9750. Scopus Author ID: 57218483603

## About the authors

*Olga V. Efremenkova* — Ph. D. in Biology, Head of the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-3131-1031. ResearcherID: AAB-3284-2022. eLIBRARY SPIN: 9342-5542. Scopus Author ID: 6603882213

*Irina A. Malanicheva* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-7623-6146. ResearcherID: AAD-1828-2022. eLIBRARY SPIN: 8314-0809. Scopus Author ID: 6602339599

*Basilya F. Vasileva* — Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9077-1965. Scopus Author ID: 57204061590

*Tatiana A. Efimenko* — Ph. D. in Biology, Senior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-9632-6854. ResearcherID: A-5085-2019. eLIBRARY SPIN: 8821-9617. Scopus Author ID: 56403188800

*Alla A. Glukhova* — Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian. ORCID: 0000-0003-0561-4709. Scopus Author ID: 57192180120

*Olga V. Kisel* — Ph. D. in Chemistry, Scientific Secretary, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-4799-1318. ResearcherID: G-6580-2017. eLIBRARY SPIN: 1153-8414. Scopus Author ID: 36770374700

*Mariia V. Demiamkova* — Junior Researcher at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-0085-1668. ResearcherID: AAT-2514-2021. eLIBRARY SPIN: 2460-8399. Scopus Author ID: 57204364679

*Hussein S. Semizaev* — Engineer at the Division of Searching for Natural Compounds that Overcome Bacterial Resistance, Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

*Nina I. Gabrielyan* — D. Sc. in medicine, Head of the Department of Endotoxemia and Purulent-Septic Complications, Federal Research Centre of Transplantology and Artificial Organs named after academician V. I. Shumakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-1941-8311. eLIBRARY SPIN: 3334-9750. Scopus Author ID: 57218483603