



УДК 577.181.5

АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ИЗ НАЗАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ СВИНЕЙ¹

© 2024 г. А. А. Баранова*, Ю. В. Закалюкина**, А. П. Тюрин*, В. А. Коршун*,
О. А. Белозерова*, М. В. Бирюков***, А. В. Моисеенко*, ***,
С. С. Терехов*, В. А. Алферова*[#]

* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения,
Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1с12

*** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1с12

Поступила в редакцию 18.07.2023 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 29.07.2023 г.

Микробиом млекопитающих считается потенциальным источником биологически активных соединений, в том числе антибиотиков. В данной работе мы изучили культивируемые микроорганизмы из назальной микробиоты венгерской домашней свиньи (*Sus domesticus*). Таксономическое положение 20 выделенных штаммов (включая 18 бактерий, по одному виду дрожжевых и мицелиальных грибов) было определено с помощью филогенетического анализа, морфологических и биохимических исследований. Штаммы были подвергнуты тестированию на чувствительность к антибиотикам и скринингу антимикробной активности. Установлено, что штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11 продуцирует четыре известные антибактериальные молекулы (пиоцианин, пиохелин, пиолутеорин, монорамнолипид). Продукция пиоцианина была индуцирована сокультивированием с грамотрицательными тест-микроорганизмами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Показано, что микробиота млекопитающих может служить ценным источником штаммов, продуцирующих антимикробные препараты, а также штаммов редких таксонов. Для ее изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью сокультивирования с тест-микроорганизмами. Методы сокультивирования – перспективный подход для изучения противомикробных препаратов из молчащих кластеров биосинтетических генов.

Ключевые слова: респираторный тракт, назальный микробиом, домашняя свинья, *Sus domesticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотики, ESEM

DOI: 10.31857/S0132342324020051, **EDN:** ONFXKK

ВВЕДЕНИЕ

Для лечения заболеваний, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорганизмами, необходимы обнаружение, исследование и введение в практику новых антибиотиков. Хотя исследование и выведение на рынок новых действующих веществ – это слож-

ные и длительные этапы [1–4], обнаружение активных соединений из природных источников остается ключевым шагом на пути к созданию новых противомикробных препаратов [5–9]. Микроорганизмы, циркулирующие в дикой природе, распространены повсеместно (рис. 1), и антибиотичес-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342324020051 для авторизованных пользователей.
Сокращения: ESEM – сканирующая электронная микроскопия с режимом естественной среды; ITS – внутренний транскрибируемый спейсер; LB – лизогенная питательная среда; PDA – картофельно-декстрозный агар; SEM – сканирующая электронная микроскопия.
[#] Автор для связи: (тел.: +7-926-611-36-49; эл. почта: alferovava@gmail.com).



Рис. 1. Повсеместное присутствие и постоянная циркуляция микроорганизмов в экосистемах.

кие вещества вырабатываются ими как средство межвидовой конкуренции и/или внутривидовой коммуникации. Традиционно поиск новых продуцентов антибиотиков долгое время проводился в микробных сообществах легкодоступных биосистем. Однако в последнее время исследователи все чаще обращаются к необычным местообитаниям живых организмов [10, 11] и активно изучают микроорганизмы-симбионты морских губок [12], насекомых [11], энтомопатогенных нематод [13] и др. Симбионты млекопитающих [14], в том числе человека [15–18], – перспективные источники биоактивных молекул с ценными фармацевтическими свойствами [19]. Адаптация к таким уникальным экологическим условиям благоприятствует селекции штаммов с вторичными метаболитами, нетоксичными для млекопитающих. Разумеется, большинство исследований посвящено микробиоте желудочно-кишечного тракта [20–23]. Однако продуценты, локализованные в области взаимодействия организма-хозяина с окружающей средой, также могут быть очень интересны, например, антимикробные соединения, производимые микробиотой кожи [24–29]. Один из таких примеров – выделение продуцента амикумацина из пасти медведя [30]. Недавно описанные бактериостатические пептиды треоглюцины продуцируются *Streptococcus suis* ATCC 43765 [31]. *S. suis* – важный патоген свиней, связанный с зоонозными инфекциями дыхательных путей. Такие антибиотики, очевидно, играют важную роль в экосистемах, регулируя микробиом хозя-

ина. Они могут защищать организм хозяина от колонизации другими микроорганизмами, включая близкородственные штаммы.

В данной работе мы изучали микробное сообщество, выделенное из микробиоты слизистой оболочки носа домашних свиней (*Sus domesticus*) породы мангалица. Мангалица – это порода свиней сального типа с кудрявой шерстью, выведенная в середине XIX века в Венгрии [32]. Эти свиньи неприхотливы: они могут переносить низкие температуры и не привередливы к питанию. Обычно их содержат на смешанных или свободных пастбищах, их рацион дополняют корнеплоды, выращенные на ферме (тыква, кормовая свекла, картофель), свежескошенная зелень летом и сено зимой. Эти животные хорошо приспособлены к постоянной жизни на открытом воздухе, могут спать в снегу, питаться подножным кормом, почти не страдают от некоторых болезней свиней [33]. Выбор данной породы свиней в качестве источника возможных продуцентов антибиотиков был обусловлен, во-первых, образом жизни животных – постоянном контакте с окружающей средой, а во-вторых, фактом, что до отбора проб животные не подвергались антибиотикотерапии.

Мы выделили в индивидуальном виде и культивировали 20 штаммов микроорганизмов, идентифицировали их с помощью полифазного подхода и изучили их способность продуцировать антибиотические метаболиты. Целью данной работы была

оценка биотехнологического потенциала назальной микробиоты домашних свиней породы мангалица.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Зимой 2022 г. были взяты пробы со слизистой носовой полости домашних свиней (порода мангалица). Первоначально пробы были взяты у трех взрослых особей, однако обнаружить антимикробную активность среди выделенных чистых культур удалось только у одной свиньи. Поэтому дальнейший поиск продуцентов антибиотиков был сосредоточен на образцах от одной особи. Всего от нее было получено 20 изолятов микроорганизмов. Нашей задачей было провести первичную оценку штаммов-продуцентов антибиотиков из этого объекта. Несмотря на очень широкие и всесторонние исследования микробиоты млекопитающих, случаев получе-

ния антибиотиков из таких местообитаний не-много [14–30].

Большинство выделенных штаммов (18 штаммов) – это бактерии, один штамм – мицелиальный и один – дрожжевой грибок (табл. S1 в дополнительных материалах). Из этих 18 первичных бактериальных изолятов 8 изолятов (SM-1, SM-2, SM-7, SM-8, SM-9, SM-12, SM-18, SM-19) показали положительный результат при окрашивании по Граму, а остальные были грамтрицательными бактериями. Филогенетический анализ первичных изолятов (табл. 1) показал идентичность изолятов SM-1 и SM-2; SM-3, SM-4 и SM-5; SM-7 и SM-8; SM-15, SM-16 и SM-17.

Дополнительное подтверждение видовой принадлежности проводили с использованием биохимических данных по утилизации субстратов, ферментативной активности и способности продуцировать серо-

Таблица 1. Филогенетический анализ выделенных штаммов микроорганизмов

Штамм	Ближайший типовой штамм в GenBank	Идентичность, %
SM-1 SM-2	<i>Nocardiopsis alba</i> DSM 43377 ^T	99.70
SM-3 SM-4 SM-5	<i>Moraxella porci</i> DSM 25326 ^T	100
SM-6	<i>Rhodotorula frigidialcoholis</i> EXF 10854 ^T	99.80
SM-7	<i>Weissella cibaria</i> JCM 12495 ^T	100
SM-8	<i>Weissella confusa</i> JCM 1093 ^T	100
SM-9	<i>Enterococcus italicus</i> DSM 15952 ^T	99.15
SM-10	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8030 ^T	99.82
SM-11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	99.85
SM-12	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805	99.88
SM-13	<i>Glaesserella parasuis</i> NCTC 4557 ^T	99.53
SM-14	<i>Proteus cibi</i> DSM 106178 ^T	99.69
SM-15 SM-16 SM-17	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 ^T	99.83
SM-18	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10 ^T	100
SM-19	<i>Arthrobacter psychrochitiniphilus</i> GP3 ^T	99.17
SM-20	<i>Chaetomium anastomosans</i> CGMCC 3.19350 ^T	100

водород (табл. S1 в дополнительных материалах). Таким образом, для идентификации выделенных микроорганизмов был использован полифазный подход, сочетающий анализ их филогенетического положения на основе анализа нуклеотидных последовательностей значимых геномных фрагментов (гены β -тубулина, ITS и 16S рПНК) (рис. S7–S10 в дополнительных материалах) с оценкой их морфологических и биохимических характеристик (табл. S1 в дополнительных материалах).

Мы использовали два метода сканирующего анализа: сканирующую электронную микроскопию (SEM) и сканирующую электронную микроскопию с режимом естественной среды (ESEM), основываясь на имеющихся на данный момент опубликованных данных о том, что ESEM и SEM могут дополнять друг друга [34]. Используя SEM, можно получать изображения поверхности биологических образцов с высоким разрешением, однако этот метод требует

дополнительной пробоподготовки. В свою очередь, ESEM позволяет исследовать препараты в их естественном состоянии, но получаемые изображения будут иметь меньшее разрешение и соотношение сигнал/шум. Результаты, полученные этими методами, могут немного отличаться из-за разницы в процессе подготовки образцов [35, 36]. SEM обладает уникальными преимуществами, такими как высокое разрешение и большая глубина резкости [37]. Основное преимущество ESEM – возможность визуализации гидратированных и непроводящих образцов, таких как биологические ткани и (бактериальные) клетки, без предварительного обезвоживания или нанесения проводящего покрытия [36, 37].

Микроморфологическая структура мицелиальных микроорганизмов (SM-1, SM-20), дрожжей (SM-6) и наиболее активного бактериального изолята (SM-11) была изучена с помощью SEM (рис. 2–5).

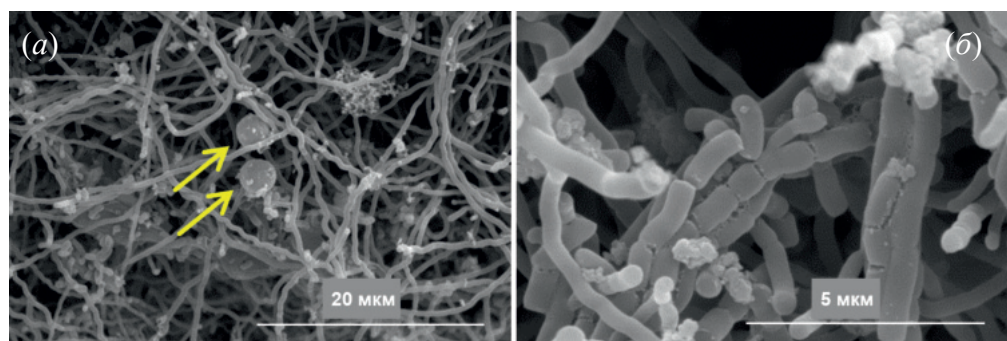


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия штамма *Nocardioopsis alba* SM-1, выращенного на среде Мюллера–Хинтона в течение 5 сут при 28°C. Стрелками показаны округлые спорангиеподобные структуры.

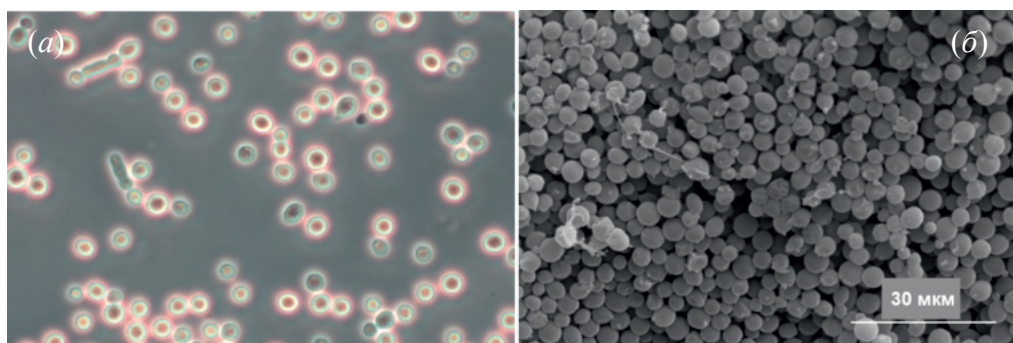


Рис. 3. Морфология *Rhodotorula frigidialcoholis* (SM-6): световая микроскопия (a), сканирующая электронная микрофотография после 3 сут инкубации на среде Мюллера–Хинтона при 28°C (б).

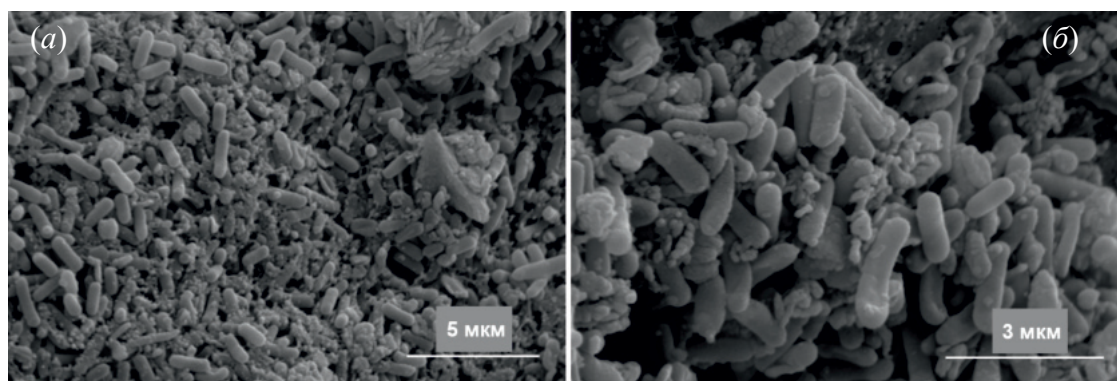


Рис. 4. Изображение со сканирующего электронного микроскопа биопленки штамма *Pseudomonas aeruginosa* SM-11, сформированной через 48 ч на среде LB при 37°C.

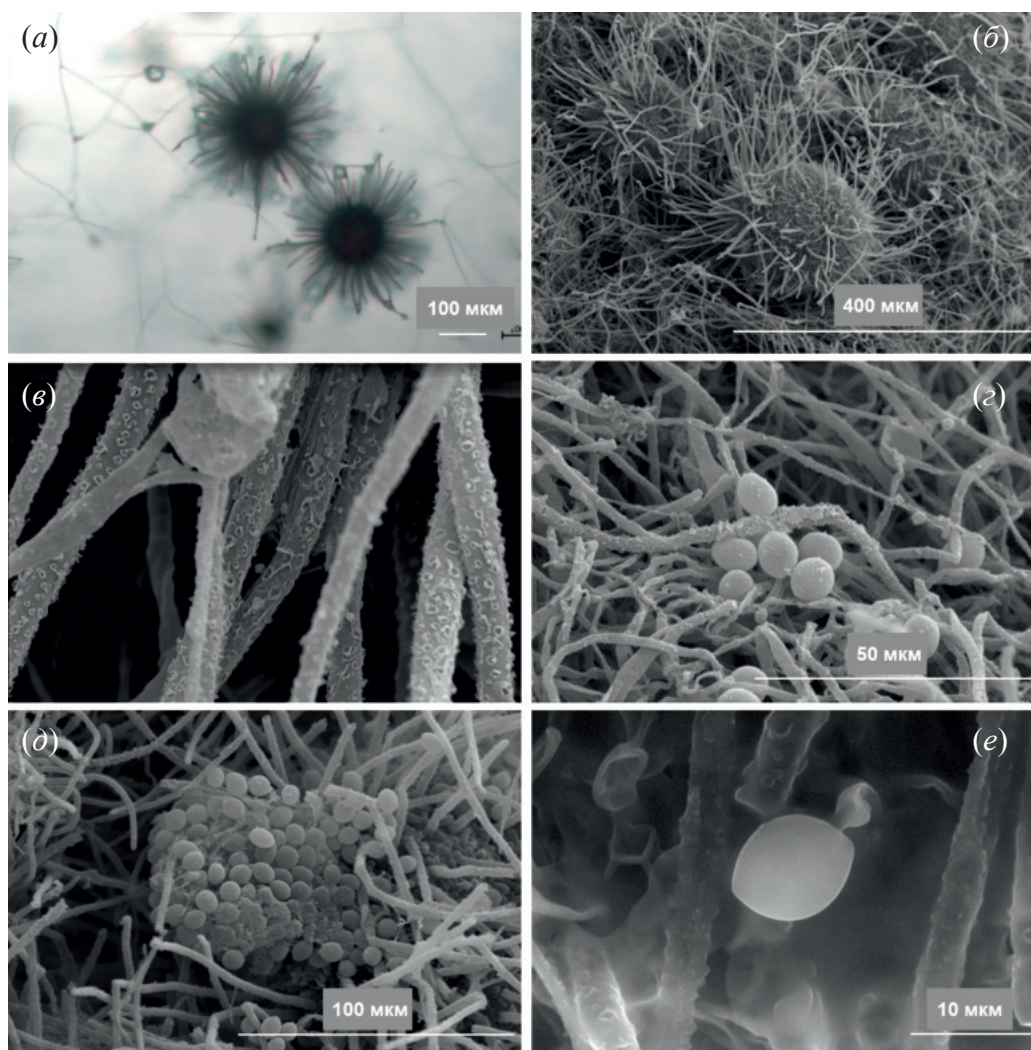


Рис. 5. Микроморфология *Chaetomium anastomosans* SM-20 на среде PDA через 7 сут инкубации при $25 \pm 1^\circ\text{C}$: зрелые плодовые тела (перитеции), рассмотренные с помощью световой микроскопии (a) и сканирующего электронного микроскопа (b), волоски перитеция в SEM (c), аскоспоры в SEM (d) и в ESEM (e).

В целом морфология штамма SM-1 (рис. 2) соответствует морфологии типового штамма *Nocardiosis alba* [38]: зигзагообразные гифы воздушного мицелия, характерные для начальных этапов споруляции (рис. 2а), и прямые гибкие гифы, фрагментирующиеся на гладкие палочковидные элементы (рис. 2б). Интересно, что на препарате штамма SM-1 были обнаружены округлые спорогангиеподобные структуры (показаны стрелкой на рис. 2), ранее не описанные для *Nocardiosis alba*.

В случае дрожжевого штамма *Rhodotorula frigidialcoholis* SM-6, используя световую микроскопию, мы обнаружили округлые одиночные или почкующиеся клетки, окруженные толстыми капсулами, морфология была дополнительно визуализирована с помощью SEM (рис. 3).

Штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11 имел тенденцию к образованию биопленок (рис. 4).

Для штамма *Chaetomium anastomosans* SM-20, в дополнение к световой и классической электронной микроскопии, мы использовали ESEM для визуализации аскоспор в их нативной форме (рис. 5).

Далее методом агаровых блоков тестировали антимикробную активность изолятов. Скрининг выявил выраженную антибиотическую активность широкого спектра действия штамма *P. aeruginosa* SM-11 против грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212), грамотрицательных бактерий (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) и дрожжей (*C. albicans* CBS 8837).

Штамм SM-11 культивировали как на жидкой, так и на твердой среде Мюллера–Хинтона. Однако процесс выделения был затруднен характерным для *P. aeruginosa* образованием матрикса биопленки [39]. Этот штамм в процессе роста выделял большое количество матрикса биопленки, поэтому выделить антибиотик из жидкой среды не представлялось возможным. В результате культивирование проводили на твердой среде для упрощения процесса выделения. Экстрагировали бутанолом, экстракты фильтровали и выпаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и фракционировали с помощью колонки с сорбентом LPS-500H. Было обнаружено,

что штамм продуцирует несколько антибиотических соединений.

Наиболее гидрофильная антибактериальная фракция элюировалась 20%-ным водным ацетонитрилом (SM11-MeCN20). Первоначально штамм SM-11 не продуцировал флуоресцентный пигмент. При исследовании антагонистической активности методом перекрестных культур штамм SM-11 начал продуцировать синий флуоресцентный пигмент, который также элюировался в SM11-MeCN20.

Фракционирование с помощью ВЭЖХ (рис. 6) показало, что первоначальная антибактериальная активность была связана с производством пиохелина. Дерепликацию проводили путем сравнения со спектром библиотеки GNPS для пиохелина (рис. S11 в дополнительных материалах). Пиохелин – железохелатирующий сидерофор, продуцируемый многими видами микроорганизмов, включая *Pseudomonas* sp. [40].

Индукцированное флуоресцентное вещество также продемонстрировало антибактериальную активность. Анализ очищенной флуоресцентной фракции показал характерное УФ-поглощение (694 нм) и точную массу соединения, соответствующую составу $C_{13}H_{10}N_2O$. Идентичность соединения с известным феназиновым антибиотиком пиоцианином была подтверждена сравнением картины фрагментации (рис. S12 в дополнительных материалах). Этот редокс-активный пигмент часто вырабатывается *P. aeruginosa* [41].

Следующую антимикробную фракцию элюировали с колонки LPS-500H 50%-ным водным ацетонитрилом. Фракционирование с помощью ВЭЖХ и МС-анализ выявили известный антибиотик пиолитеорин (рис. 7). Пиолитеорин – хлорированное производное пиррола с антибиотической, противогрибковой и гербицидной активностью [42], характерной для *Pseudomonas* sp.

Самым гидрофобным антибиотиком, элюируемым ацетонитрилом, оказался монорамнолипид RhaC10C10 (рис. 8). Рамнолипиды – это гликолипидные биосурфактанты с привлекательными свойствами, включая низкую токсичность, быструю биоразлагаемость и стабильное образование микроэмульсий [43].

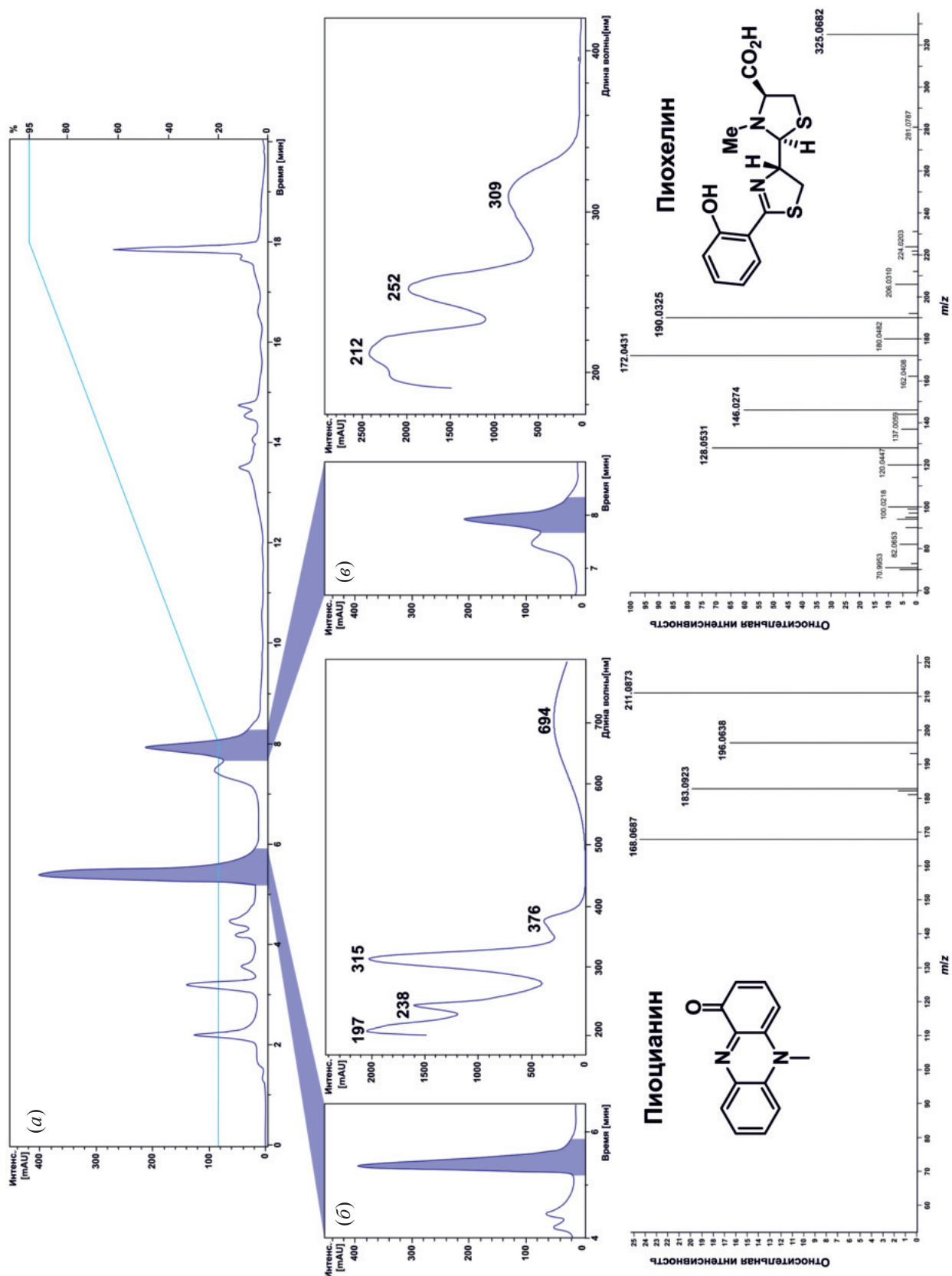


Рис. 6. Профиль ВЭЖХ (контролируется по УФ-поглощению при 350 нм) и условия элюирования (голубая линия) для SM-11-MeCN20 (а), УФ-спектры и картина фрагментации MS² ([M + H]⁺, масс-спектр HCD в режиме регистрации положительно заряженных ионов) для пиоциана (б) и пиохелина (в).

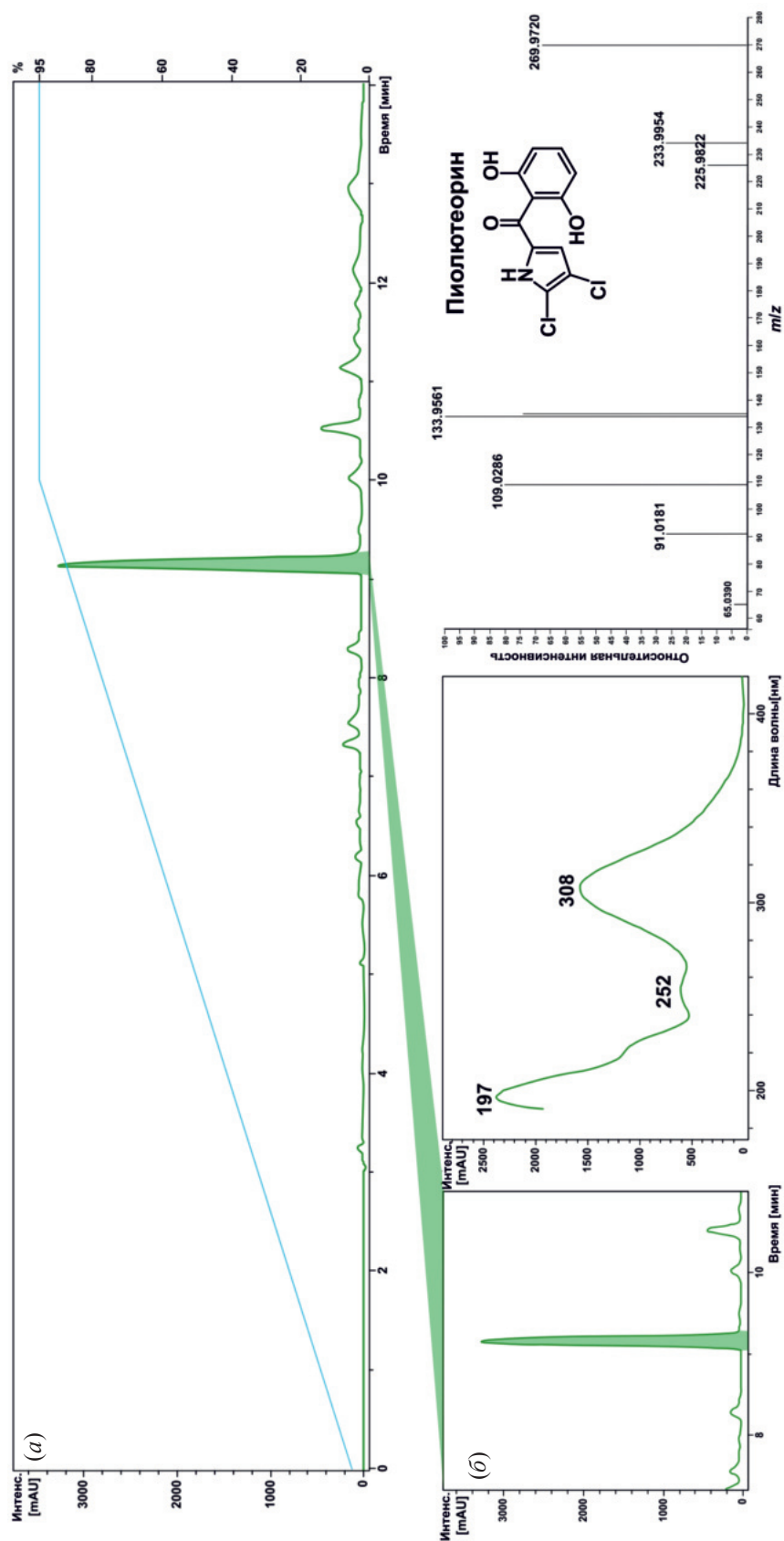


Рис. 7. Профиль ВЭЖХ (контролируется по УФ-поглощению при 350 нм) и условия элюирования (голубая линия) для SM-11-MeCN50 (а), УФ-спектр и схема фрагментации MS² ([M – H][–], в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов) для пиолотеорина (б).

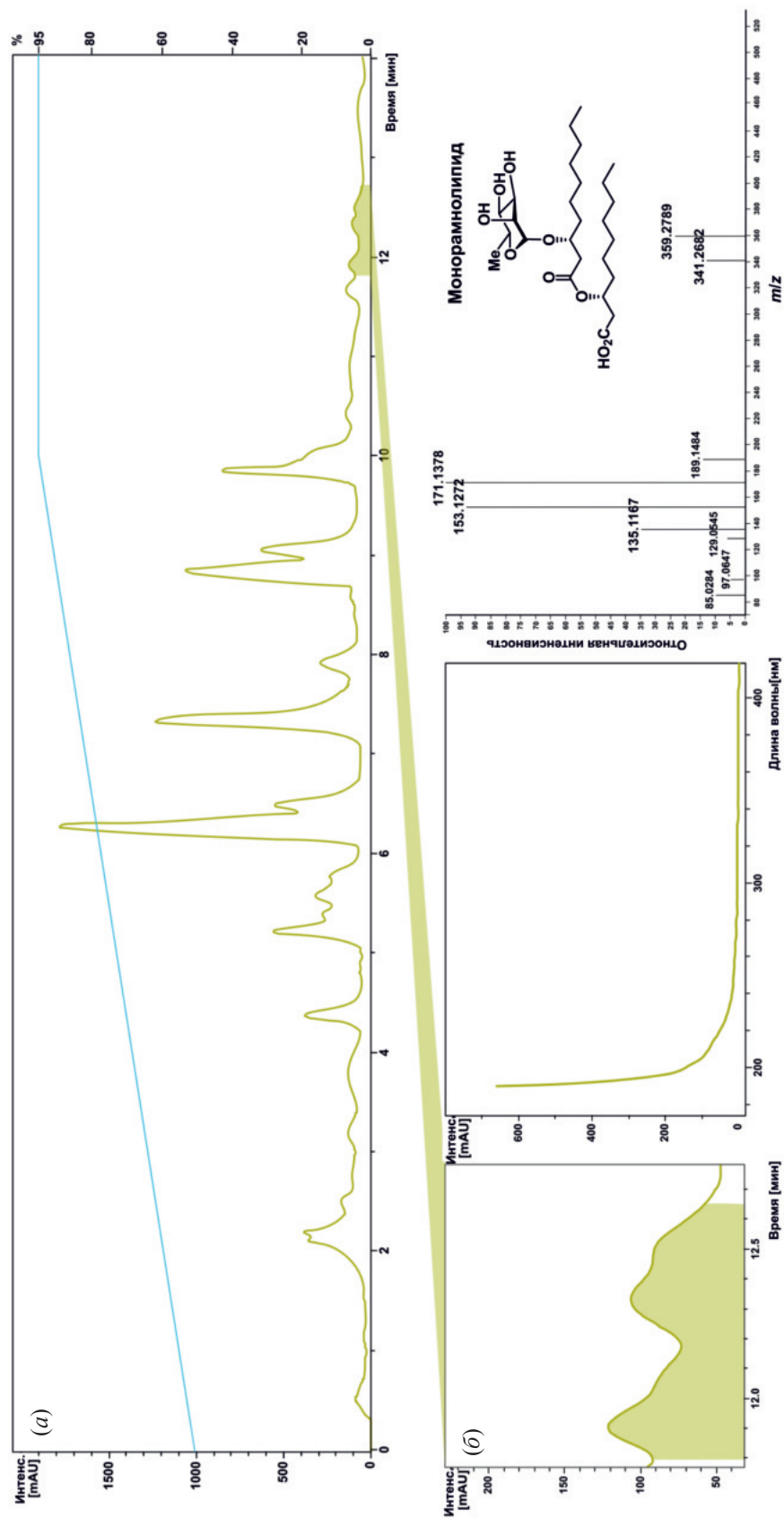


Рис. 8. Профиль ВЭЖХ (контролируется по УФ-поглощению при 210 nm) и условия элюирования (голубая линия) для SM-11-MeCN100 (a). УФ-спектр и схема фрагментации MS² для монотерпенолипида RhaC10C10 (б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поиск продуцентов биологически активных соединений среди микроорганизмов, ассоциированных с животными, в силу их поразительного разнообразия, имеет неисследованные перспективы [11, 44, 45]. Однако до сих пор такие работы были сосредоточены больше на беспозвоночных хозяевах [46–48]. Тем не менее позвоночные, включая млекопитающих, также представляют собой перспективный источник микроорганизмов с антимикробной активностью [30].

Общепризнанно, что свинья считается лучшей биологической моделью человека в биомедицинских экспериментах из-за сходства широкого спектра анатомических и физиологических характеристик [49, 50]. Восприимчивость патогенных бактерий свиней к антибиотикам и их возможная передача человеку также привлекает внимание исследователей [51–53].

Чаще всего фокус исследования в подобных работах сосредоточен на анализе состава и возможных функций микробиома желудочно-кишечного тракта хозяина с акцентом на параметры здоровья животного [54–56]. Однако не менее важны микробные сообщества, населяющие поверхность кожи, ротовую полость, мочеполовую систему и дыхательные пути.

Носовая микробиота домашних свиней была объектом исследования лишь в нескольких работах [20, 57–61], где она изучалась с точки зрения здоровья дыхательных путей свиней и ее участия в патогенезе, вызванном инфекцией *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* и других патогенов. Однако микробные сообщества, ассоциированные с домашними свиньями, еще не стали источником для поиска антибиотически активных штаммов. В данном исследовании мы охарактеризовали биосинтетический потенциал микроорганизмов, присутствующих в этой специфической

экологической нише, используя стандартный культурально-зависимый подход.

Стоит отметить, что нос свиньи – это не просто орган обоняния, а слизистая оболочка носа – не только часть верхних дыхательных путей, как у других животных, включая человека. Нос свиньи – это орган осязания, и с древних времен он служит диким и домашним свиньям для поиска и извлечения пищи, находясь в постоянном контакте с почвой, растительными остатками, отходами жизнедеятельности и т.д. Таким образом, в условиях постоянного притока микроорганизмов извне микробные сообщества, населяющие ноздри свиней, должны характеризоваться стабильностью и насыщенностью. Не будет преувеличением сказать, что с точки зрения микробной экологии нос свиньи – “горячая точка”, где благодаря постоянному взаимодействию между иммунной системой хозяина и разнообразным пулом микроорганизмов поддерживается высокая интенсивность межорганизменных взаимодействий – от симбиотических до антагонистических. С одной стороны, часть этой микробиоты состоит из видов, характерных для свиней, и может рассматриваться как относительно постоянный компонент назальной микробиоты, а с другой стороны, присутствует переходная микробиота, которая меняется в результате взаимодействия с внешней средой.

Среди видов микроорганизмов, выделенных в данном исследовании (табл. 1), прежде всего следует отметить идентификацию характерных представителей назальной микробиоты свиней, обнаруженных в более ранних исследованиях [20, 57–61]: *Moraxella porci* (SM-3, SM-4, SM-5), *Glaesserella parasuis* (SM-13) и *Weissella* sp. (SM-7, SM-8). Кроме того, бактерии, характерные для животных в целом и свиней в частности, могут включать представителей порядка *Lactobacillales*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (штамм SM-12) и *Enterococcus italicus* (штамм SM-9). Также неудивительно встретить виды порядка

Enterobacteriales, представители которого часто ассоциируются с очень широким кругом животных, а также часто выделяются из пищи: *Citrobacter freundii* (штамм SM-10), *Serratia marcescens* (штаммы SM-15, SM-16, SM-17) и *Proteus cibi* (штамм SM-14) [62]. Вполне естественно выделение из слизистой носа *Bacillus subtilis* (штамм SM-18), *Pseudomonas aeruginosa* (SM-11) и актинобактерий *Nocardiosis alba* (SM-1, SM-2), которые, хотя и широко распространены в природе, в основном встречаются в образцах животных, среди которых свиньи занимают третье и пятое места соответственно (согласно проекту Microbial Atlas Project, microbeatlas.org) [63].

В то же время *Arthrobacter psychrochitiniphilus* SM-19, *Rhodotorula frigidialcoholis* SM-6 и *Chaetomium anastomosans* SM-20, которые ранее не были обнаружены у свиней, по-видимому, представляют собой лишь переходные виды, заимствованные из внешней среды [64–66].

Многие виды, обнаруженные нами у здоровых животных, характеризуются способностью вырабатывать антибиотики, токсины и другие биоактивные метаболиты, которые они обычно используют для общения или конкуренции друг с другом [11] (табл. 2).

Скрининг антимикробной активности среди всех изолятов показал, что штамм SM-11 наиболее активен и способен подавлять рост грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212), грамотрицательных бактерий (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853) и дрожжей (*C. albicans* CBS 8837). Культивирование, очистка и идентификация активного соединения показали, что SM-11 продуцирует феназиновый пиоцианин, редокс-активный пигмент, производимый 90–95% изолятов *P. aeruginosa* [41].

В аксенических условиях, после одного или двух пассажей, штамм SM-11 терял способность продуцировать пиоцианин, но сокультивирование с другими микроорганизмами немедленно восстанавли-

вало эту способность, которая легко контролируется благодаря характерной флуоресценции и оптическим свойствам этого соединения (максимум поглощения при 694 нм). Интересно, что штамм SM-11 не продуцировал токсичный пиоцианин при выделении из свиной микробиоты, но его производство индуцировалось при культивировании с тест-микроорганизмами. Индукция биосинтеза антибиотиков [80], в том числе с помощью методов совместного культивирования, для штаммов, ассоциированных с млекопитающими, может раскрыть их скрытый биосинтетический потенциал.

В сочетании со способностью образовывать устойчивые биопленки (рис. 4) благодаря чувству кворума (quorum sensing) и высокой ферментативной активности в отношении многих субстратов (табл. S1 в дополнительных материалах), наибольшей среди других выделенных бактерий способностью синтезировать сидерофоры, например, пиохелин (рис. 6), делают штамм SM-11 мощным конкурентом и угрозой как для других микроорганизмов, так и для клеток хозяина. Тем не менее назальное сообщество, выделенное культурально-зависимым методом, довольно разнообразно, и *P. aeruginosa* не вытесняет другие виды. Вполне вероятно, что один из сдерживающих факторов колонизации слизистой оболочки верхних дыхательных путей – присутствие молочнокислых бактерий (LAB), также обнаруженных в слизистой свиней: штаммы SM-7, SM-8 [81], SM-9 [82] и, главным образом, SM-12. LAB способны снижать подвижность многих патогенных бактерий за счет производства ацетата [76]. Более того, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* SM-12 обладает способностью производить низины – полициклические антибактериальные пептиды класса лантибиотиков с широким спектром активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий [83].

Носовая полость может рассматриваться как “входные ворота” в организм животного, где бактериаль-

Таблица 2. Характеристика выделенных штаммов микроорганизмов

Штамм	Ближайший типовой штамм (идентичность в GenBank, %)	Биологически активное соединение	Активность	Ссылка
SM-1 SM-2	<i>N. alba</i> DSM 43377 ^T (99.70%)	Производные феназина Нокардиопептидины А–С (nocardiopsistins A–C) Гризеусин D (griseusin D) Нокапироны (nocarugones) Метоксинефгумицин (methoxuneihumicin)	Антибактериальная Антибактериальная Противогрибковая Противораковая Противораковая	[67, 68]
SM-3 SM-4 SM-5	<i>M. porci</i> DSM 25326 ^T (100%)	Не исследовано	Видимо, оппортунистический, обнаруживается как у здоровых, так и у больных свиней	[69, 70]
SM-6	<i>R. frigidicola</i> EXF 10854 ^T (99.80%)	Не исследовано	Нет данных	[65]
SM-7 SM-8	<i>W. cibaria</i> JCM 12495 ^T (100%) <i>W. confusa</i> JCM 1093 ^T (100%)	Вайселлицины (weissellicins)	Активность широкого спектра действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий (например, <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. lactis</i> и др.)	[71]
SM-9	<i>E. italicus</i> DSM 15952 ^T (99.15%)	Продукция H ₂ O ₂ Энтероцины (Enterocins)	Антибактериальная активность в отношении <i>Listeria monocytogenes</i>	[72, 73]
SM-10	<i>C. freundii</i> ATCC 8030 ^T (99.82%)	Пептидные термостабильные энтерооксины	Вызывают диарею у человека и млекопитающих	[74]
SM-11	<i>P. aeruginosa</i> JCM 5962 ^T (99.85%)	Многочисленные активные соединения	Антибактериальная, противогрибковая	[75]
SM-12	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM 5805 (99.88%)	Лантибиотик низин, ацетат	Активность широкого спектра действия нарушает подвижность патогенных бактерий <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Leptospira</i> и др.	[76]
SM-13	<i>G. parasuis</i> NCTC 4557 ^T (99.53%)	Не исследовано	Комменсал в верхних дыхательных путях свиней, этиологический агент болезни Гляссера	[77]

Таблица 2. (окончание)

Штамм	Ближайший типовой штамм (идентичность в GenBank, %)	Биологически активное соединение	Активность	Ссылка
SM-14	<i>P. cibi</i> DSM 106178 ^T (99.69%)	Не исследовано	Нет данных	[62]
SM-15	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 ^T (99.83%)	Бактериоцин (марцесцин) (bacteriocin (marcescin))	Ингибирует рост <i>Corynebacterium diptheriae</i> и <i>Staphylococcus aureus</i>	[78]
SM-16				
SM-17				
SM-18	<i>B. subtilis</i> DSM 10 ^T (100%)	Субтилилин (subtilin), субтилиозин (subtilosin), бацилизин (bacilysin), сурфактин (surfactin), фактор убийства Skf и спороассоциированный антимикробный полипептид TasA	Широкий спектр антибактериального и противогрибкового действия	[79]
SM-19	<i>A. psychrochitiniphilus</i> GP3 ^T (99.17%)	Не исследовано	Нет данных	[64]
SM-20	<i>C. anastomosans</i> CGMCC 3.19350 ^T (100%)	Не исследовано	Нет данных	[66]

ное богатство и разнообразие верхних дыхательных путей действует как естественный фильтр, ограничивающий попадание микроорганизмов извне в нижние отделы респираторного тракта [18]. Эффективность и стабильность такого фильтра во многом определяется биотическими взаимоотношениями в микробном сообществе, которые могут быть реализованы через производство метаболитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор проб и выделение штаммов. Образцы были взяты в январе 2022 г. от однолетних половозрелых домашних свиней (две самки и один самец, порода венгерская мангалица, вес 150–160 кг), которые не были серьезно больны, не проходили лечение антибиотиками и не были вакцинированы. Свиньи постоянно находились на открытом воздухе. Их ежедневный зимний рацион состоял из смеси дробленого ячменя и пшеницы, корнеплодов (тыква, кормовая свекла, картофель) и сухого сена. Свиньи были выращены в селе Хомбуй-Батырево Чувашской Республики Российской Федерации (55.293515 N, 47.088331 E). Средняя температура в январе 2022 г. составляла –9°C, влажность 85% при устойчивом снежном покрове (~40 см). Пробы были взяты из обеих ноздрей носа свиньи. Свобы (зонд-тампоны) с образцами слизистой носа хранили в транспортной среде Стюарта при 0–4°C в течение 20 ч до обработки (рис. 9).

Образцы суспендировали в трех экземплярах в 10 мл 0.9%-ного раствора NaCl, полученную суспензию использовали для инокуляции. Инокулят (1 мл на чашку) распределяли на квадратные чашки Петри размером 15 × 15 см с твердой питательной средой Сабуро (с налидиксовой кислотой, 30 мкг/мл, и без антибиотиков) или Мюллера–Хинтона (HiMediaLab) (с антибиотиком амфотерицином В, 50 мкг/мл, и без антибиотиков). Чашки инкубировали при 28°C в аэробных условиях в течение 10 сут, чтобы обеспечить выделение медленно растущих микроорганизмов, поскольку им требуется более длительный период культивирования для образования

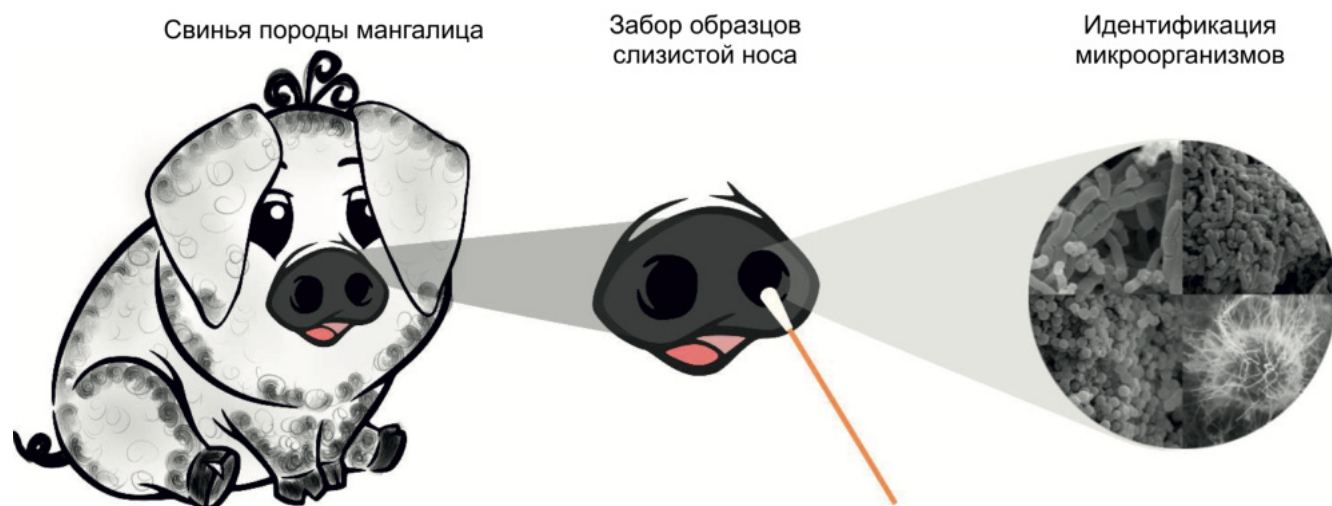


Рис. 9. Сбор образцов и выделение микроорганизмов.

колоний. По мере роста колоний их переносили, очищали на картофельно-декстрозном агаре (грибы) или агаре Мюллера–Хинтона (бактерии). Штаммы хранили в растворе глицерина (20%, v/v) при -87°C .

Антимикробная и антагонистическая активность. Антимикробную активность тестировали методом диффузии в агар в отношении *C. albicans* CBS 8837, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Антагонистическую активность штаммов определяли методом поперечных штрихов [84] (рис. 10а). В дополнение к анализу поперечных полос антибиотическую активность проверяли методом агаровых блоков (рис. 10б) [85].

Метод поперечных штрихов. Изолированные культуры наносили перекрестными штрихами в виде одной линии на затвердевшую питательную среду (агар Мюллера–Хинтона для бактерий, PDA для грибов) в чашке Петри, грибковые штаммы инкубировали при 28°C в течение 7 сут, а бактериальные тест-культуры – при 37°C в течение 2 сут. Затем тест-микроорганизмы пересеивали перпендикулярно исходной полосе изолятов. Чашки с грибковыми тест-культурами инкубировали при 28°C в течение 2 сут, а бактериальные тест-культуры – при 37°C в течение

1 сут. Антагонистическую активность оценивали по зоне ингибирования вокруг изолятов. Если тест-культура чувствительна к штаммам-продуцентам антибиотиков, то она не будет расти рядом с их колониями.

Метод агаровых блоков. Из выросших на агаризованной среде колоний вырезали агаровый блок диаметром 5 мм и переносили его в центр чашки с тест-культурами. Чашки с грибковыми тест-культурами инкубировали при 28°C в течение 2 сут. Чашки с бактериальными тест-культурами инкубировали при 37°C в течение 2 сут, затем измеряли диаметр зоны ингибирования роста вокруг агарового блока.

Антимикробную активность *in vitro* определяли с помощью диффузионного анализа в агаре в соответствии с рекомендациями CLSI [86–88].

Ассимиляция микроорганизмами субстратов, окрашивание по Граму. Биохимическое тестирование выделенных штаммов проводили на фильтровальных бумажных дисках, пропитанных различными субстратами и хромогенными индикаторами (Микроген, Россия), по методике, рекомендованной производителем. Морфологическую характеристику выделенных микроорганизмов проводили путем окрашивания по Граму [89].

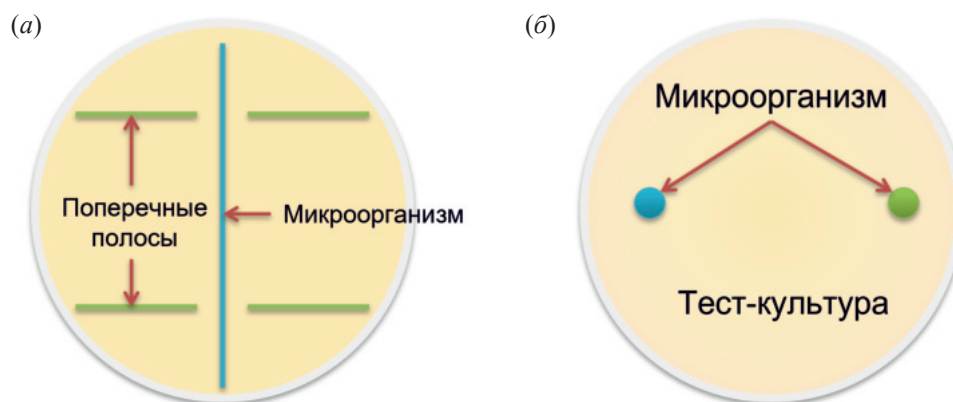


Рис. 10. Дизайн экспериментов по тестированию антагонистической активности выделенных микроорганизмов: (а) – метод поперечных полос, (б) – метод агаровых блоков.

Таксономическая идентификация выделенных штаммов. Амплификация генов и филогенетический анализ. Геномную ДНК изолятов выделяли с помощью набора LumiPure Kit (Люмипроб, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию различных участков ДНК грибов и бактерий проводили с использованием соответствующих комбинаций праймеров (табл. 3). Реакционные смеси для ПЦР содержали 0.5 мкл матричной ДНК, 10 мкл готового полимеразного реагента 2× PCR Basic Mix (Lumiprobe, Россия), 0.05 мкл 100 мкМ каждого праймера и стерильную воду Milli-Q до конечного объема 20 мкл.

Продукты ПЦР разделяли электрофорезом на 1%-ном агарозном геле и вырезали соответствующие полосы. Ампликоны очищали с помощью набора для экстракции ДНК в геле (Люмипроб, Россия) и передавали для секвенирования в Центр коллективного пользования «Геном» (Москва, Россия). Секвенирование проводили с использованием набора ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Waltham, США) на анализаторе ДНК Applied Biosystems 3730 (Life Technologies, Carlsbad, США). Последовательности обрабатывали и собирали с помощью программного обеспечения GeneStudio Pro (версия 2.2.0.0).

Таксономическую принадлежность изолятов оценивали, используя соответствующие генные последовательности в качестве запроса в веб-сервисах

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и EzTaxon (www.ezbiocloud.net). Филогенетический анализ выполняли в программе MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/mega7/>). Филограмму для бактерий строили методом максимального подобия (maximum likelihood), для дрожжей, гриба и актиномицетов – методом присоединения соседей (neighbor joining).

Электронная микроскопия. Образцы для сканирующей электронной микроскопии (SEM) были подготовлены в соответствии с литературными данными [93]. Образцы подвергали сушке в критической точке и покрытию золотом. Изображения SEM получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Thermo Quattro S (Thermo Fisher Scientific, Нидерланды), работающего при напряжении 15–30 кВ, увеличение от 600× до 39600×.

Исследования с помощью сканирующей электронной микроскопии в естественной среде (ESEM) проводили с использованием стадии холодного образца. Для предотвращения обезвоживания образцы предварительно охлаждали до 4°C, а перед откачкой воды из камеры рядом с образцом помещали маленькие капли воды. Давление водяных паров и температуру ступени изменяли для поддержания равновесия образца, что минимизировало эффект обезвоживания. Изображения ESEM были получены во

Таблица 3. ПЦР-праймеры и условия термоциклирования

Организм	Штамм	Аmplифицированные гены	Праймеры	Условия термоциклирования
Грибы	SM-20	Ген β -тубулина	Bt2a/Bt2b [90]	95°C – 5 мин; (95°C – 10 с, 58°C – 15 с, 72°C – 30 с) $\times$ 40; 72°C – 5 мин
Дрожжи	SM-6	ITS (внутренний транскрибируемый спейсер)	ITS1/ITS4 [91]	95°C – 5 мин; (95°C – 10 с, 58.5°C – 15 с, 72°C – 30 с) $\times$ 40; 72°C – 5 мин
Бактерии	SM-1–SM-5, SM-7–SM-19	Фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК	27F/1492R [92]	95°C – 6 мин; (95°C – 20 с, 57°C – 20 с, 72°C – 1 мин 20 с) $\times$ 35; 72°C – 5 мин

вторичных электронах с детектором GSED и рабочим расстоянием 7–8 мм.

Выделение и идентификация антибиотиков. Штаммы бактерий культивировали в бульоне Мюллера–Хинтона (HiMediaLab), а грибы – в жидком картофельно-декстрозном бульоне (HiMediaLab). Для получения антибиотиков среду Мюллера–Хинтона и картофельно-декстрозный бульон (50 мл в 250 мл колбе Эрленмейера) инокулировали 1 мл соответствующей посевной культуры. Затем колбы инкубировали при 28°C на шейкере (250 об/мин) в течение 7 сут. Пробы культуральной жидкости отбирали каждый день, а антибиотическую активность оценивали методом диффузии в агар.

После скрининга на антибиотическую активность штамм SM-11 был отобран для дальнейшего изучения. Для получения антибиотика штамм SM-11 культивировали на агаре Мюллера–Хинтона (чашки Петри диаметром 90 мм) при 37°C в течение 2 сут. Антибиотическую активность штамма SM-11 контролировали методом диффузии в агар, используя *B. subtilis* ATCC 6633 в качестве тест-микроорганизма.

Экстракция и установление структуры антибиотиков. Для экстракции SM-11 из суточных культур в бульоне и агаре использовали *n*-бутанол. Полученный экстракт упаривали в вакууме, остаток растворяли в воде и фракционировали с использованием колонки с сорбентом LPS-500-H (Techno-

sorbent, Россия). После первоначальной сорбции проводили поэтапную элюцию с возрастающей концентрацией ацетонитрила в воде: 0%→10%→20%→50%→100% MeCN. Фракции с антимикробной активностью анализировали методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием колонки 4.6 $\times$ 250 мм (Macherey-Nagel, Германия; Nucleodur C18 Gravity, 5 мкм). Хроматографию проводили в линейном градиенте ацетонитрила в воде при скорости потока 1 мл/мин с детекцией по поглощению при 210, 254, 350 и 500 нм. Использовали следующие градиенты: MeCN20 (20% изократическая элюция в течение 8 мин, 20→95% линейный градиент и изократическая элюция с 95% в течение 2 мин), MeCN50 (5→95% линейный градиент и изократическая элюция с 95% в течение 4 мин), MeCN100 (50→95% линейный градиент в течение 10 мин и изократическая элюция с 95% в течение 4 мин).

LC-MS-анализ проводили на системе ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, Германия), подключенной к масс-спектрометру Orbitrap Fusion Lumos (ThermoFisher Scientific, США). Образцы разделяли на колонке Luna Omega C18 (Phenomenex, США; 2.5 мкм 100 Å 100 $\times$ 2.1 мм) при скорости потока 200 мкл/мин в линейном градиенте ацетонитрила в воде с добавлением 10 mM формиата аммония и 0.1%-ной муравьиной кислоты. УФ-поглощение регистрировали при длине волны 220 нм. MS1- и

MS2-спектры регистрировали с разрешением 30 и 15K соответственно с фрагментацией HCD. Дерепликацию проводили с использованием библиотеки MS-спектров GNPS [94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены микроорганизмы культивируемой назальной микробиоты здоровых домашних свиней и оценен их биотехнологический потенциал в качестве продуцентов антимикробных соединений. Таксономический состав культивируемой микробиоты был изучен на основании полифазного подхода. В результате скрининга антибиотической активности был отобран штамм *Pseudomonas aeruginosa* SM-11. С помощью ВЭЖХ-МС-метаболомики в экстракте данной культуры идентифицирован ряд антимикробных соединений (пиоцианин, пиохелин, пиолотеорин и гликолипид RhaC10C10). Показано, что продукция вторичных метаболитов существенно изменяется при совместном культивировании штамма SM-11 с другими бактериями. В результате было показано, что микробиота, ассоциированная с млекопитающими, представляет существенный интерес в качестве источника антимикробных соединений, а для ее дальнейшего изучения наиболее перспективны биотехнологические подходы, основанные на индукции биосинтеза вторичных метаболитов с помощью сокультивирования с тест-микроорганизмами.

БЛАГОДАРНОСТИ

SEM-исследования проводили на совместной научной установке “Электронная микроскопия в науках о жизни” (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ), уникальная установка “Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия”).

Авторы выражают благодарность А. В. Коршуну за полезные советы по оформлению публикации.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00409, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00409/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Вред животным во время всех манипуляций по отбору проб был минимизирован в соответствии с принципами надлежащей ветеринарной практики и Федеральным законом “Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации” от 27 декабря 2018 года (№ 498-ФЗ). Все процедуры проводили с информированного согласия владельца животного и под его наблюдением. Согласно местному законодательству, данная процедура не требовала специального одобрения Этического комитета.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hutchings M.I., Truman A.W., Wilkinson B. // Curr. Opin. Microbiol. 2019. V. 51. P. 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
2. Miethke M., Pieroni M., Weber T., Brönstrup M., Hammann P., Halby L., Arimondo P.B., Glaser P., Aigle B., Bode H.B., Moreira R., Li Y., Luzhetskyy A., Medema M. H., Pernodet J., Stadler M., Tormo J.R., Genilloud O., Truman A.W., Weissman K.J., Takano E., Sabatini S., Stegmann E., Brötz-Oesterhelt H., Wohleben W., Seemann M., Empting M., Hirsch A.K.H., Loretz B., Lehr C.M., Titz A., Herrmann J., Jaeger T., Alt S., Hesterkamp T., Winterhalter M., Schiefer A., Pfarr K., Hoerauf A., Graz H., Graz M., Lindvall M., Ramurthy S., Karlén A., Dongen M., Petkovic H., Keller A., Peyrane F., Donadio S., Fraisse L., Pid-dock L.J.V., Gilbert I.H., Moser H.E., Müller R. // Nat. Rev. Chem. 2021. V. 5. P. 726–749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
3. Bernal F.A., Hammann P., Kloss F. // Curr. Opin. Biotechnol. 2022. V. 78. P. 102783.

- <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102783>
4. Cook M.A., Wright G.D. // *Sci. Transl. Med.* 2022. V. 14. P. eabo7793.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>
 5. Dai J., Han R., Xu Y., Li N., Wang J., Dan W. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 101. P. 103922.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103922>
 6. Atanasov A., Zotchev S., Dirsch V., Orhan I., Banach M., Rollinger J., Barreca D., Weckwerth W., Bauer R., Edward B., Majeed M., Bishayee A., Bochkov V., Bonn G., Braidly N., Bucar F., Cifuentes A., D'Onofrio G., Bodkin M., Supuran C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>
 7. Newman D.J., Cragg G.M. // *J. Nat. Prod.* 2020. V. 83. P. 770–803.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
 8. Baranova A.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Life.* 2023. V. 13. P. 1073.
<https://doi.org/10.3390/life13051073>
 9. Walesch S., Birkelbach J., Jézéquel G., Haeckl F.P.J., Hegemann J.D., Hesterkamp T., Hirsch A.K.H., Hammann P., Müller R. // *EMBO Rep.* 2023. V. 24. P. e56033.
<https://doi.org/10.15252/embr.202256033>
 10. Баранова А.А., Алферова В.А., Коршун В.А., Тюрин А.П. // *Биоорг. химия.* 2020. Т. 46. С. 593–665. [Baranova A.A., Alferova V.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2020. V. 46. P. 903–971.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162020060023>
 11. Baranova A.A., Zakalyukina Y.V., Ovcharenko A.A., Korshun V.A., Tyurin A.P. // *Biology (Basel).* 2022. V. 11. P. 1676.
<https://doi.org/10.3390/biology11111676>
 12. Abdelaleem E.R., Samy M.N., Abdelmohsen U.R., Desoukey S.Y. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2022. V. 74. P. 8–16.
<https://doi.org/10.1111/lam.13559>
 13. Imai Y., Meyer K.J., Iinishi A., Favre-Godal Q., Green R., Manuse S., Caboni M., Mori M., Niles S., Ghiglieri M., Honrao C., Ma X., Guo J.J., Makriyanis A., Linares-Otaya L., Böhringer N., Wuisan Z.G., Kaur H., Wu R., Mateus A., Typas A., Savitski M.M., Espinoza J.L., O'Rourke A., Nelson K.E., Hiller S., Noinaj N., Schäberle T.F., D'Onofrio A., Lewis K. // *Nature.* 2019. V. 576. P. 459–464.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1791-1>
 14. Wang L., Ravichandran V., Yin Y., Yin J., Zhang Y. // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 492–504.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.003>
 15. Donia M.S., Fischbach M.A. // *Science.* 2015. V. 349. P. 1254766.
<https://doi.org/10.1126/science.1254766>
 16. Mousa W.K., Athar B., Merwin N.J., Magarvey N.A. // *Nat. Prod. Rep.* 2017. V. 34. P. 1302–1331.
<https://doi.org/10.1039/C7NP00021A>
 17. Chiumento S., Roblin C., Kieffer-Jaquinod S., Tachon S., Leprêtre C., Basset C., Adityarini D., Olleik H., Nicoletti C., Bornet O., Iranzo O., Maresca M., Hardré R., Fons M., Giardina T., Devillard E., Guerlesquin F., Couté Y., Atta M., Perrier J., Lafond M., Duarte V. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. P. eaaw9969.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw9969>
 18. Barber C.C., Zhang W. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2021. V. 48. P. kuab010.
<https://doi.org/10.1093/jimb/kuab010>
 19. Lewis K. // *Cell.* 2020. V. 181. P. 29–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.056>
 20. Pirolo M., Espinosa-Gongora C., Alberdi A., Eisenhofer R., Soverini M., Eriksen E.Ø., Pedersen K.S., Guardabassi L. // *Anim. Microbiome.* 2023. V. 5. P. 5.
<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00226-y>
 21. Petrelli S., Buglione M., Rievieccio E., Ricca E., Baccigalupi L., Scala G., Fulgione D. // *Anim. Microbiome.* 2023. V. 5. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s42523-023-00235-x>
 22. Vasco K., Guevara N., Mosquera J., Zapata S., Zhang L. // *Anim. Microbiome.* 2022. V. 4. P. 65.
<https://doi.org/10.1186/s42523-022-00218-4>
 23. Kauter A., Epping L., Semmler T., Antao E.-M., Kannapin D., Stoeckle S.D., Gehlen H., Lübke-Becker A., Günther S., Wieler L.H., Walther B. // *Anim. Microbiome.* 2019. V. 1. P. 14.
<https://doi.org/10.1186/s42523-019-0013-3>
 24. O'Sullivan J.N., Rea M.C., O'Connor P.M., Hill C., Ross R.P. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2019. V. 95. P. fty241.

- <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy241>
25. Wertz P.W., De Szalay S. // *Antibiotics*. 2020. V. 9. P. 159. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040159>
26. O'Sullivan J.N., O'Connor P.M., Rea M.C., O'Sullivan O., Walsh C.J., Healy B., Mathur H., Field D., Hill C., Ross R.P. // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. P. e00639-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00639-19>
27. O'Neill A.M., Worthing K.A., Kulkarni N., Li F., Nakatsuji T., McGrosso D., Mills R.H., Kalla G., Cheng J.Y., Norris J.M., Pogliano K., Pogliano J., Gonzalez D.J., Gallo R.L. // *eLife*. 2021. V. 10. P. e66793. <https://doi.org/10.7554/eLife.66793>
28. Swaney M.H., Kalan L.R. // *Infect. Immun.* 2021. V. 89. P. e00695-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-20>
29. Heilbronner S., Krismer B., Brötz-Oesterhelt H., Peschel A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 726–739. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00569-w>
30. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., Kostryukova E.S., Ziganshin R.H., Kornienko M.A., Vanyushkina A.A., Bukato O.N., Ilina E.N., Vlasov V.V., Severinov K.V., Gabibov A.G., Altman S. // *PNAS*. 2018. V. 115. P. 9551–9556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811250115>
31. Covington B.C., Seyedsayamdost M.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2022. V. 144. P. 14997–15001. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05790>
32. Egerszegi I., Rátky J., Solti L., Brüssow K.-P. // *Arch. Anim. Breed.* 2003. V. 46. P. 245–256. <https://doi.org/10.5194/aab-46-245-2003>
33. Breed cards: Mangalitsa (Swallow-Belly Mangalitsa) Pig. https://www.pig333.com/articles/breed-cards-mangalitsa-swallow-belly-mangalitsa-pig_15977/
34. Alhede M., Qvortrup K., Liebrechts R., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012. V. 65. P. 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x>
35. Tihlaříková E., Neděla V., Đorđević B. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 2300. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38835-w>
36. Muscariello L., Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Cafiero G., Barbarisi A. // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 205. P. 328–334. <https://doi.org/10.1002/jcp.20444>
37. Bergmans L., Moisiadis P., Van Meerbeek B., Quirynen M., Lambrechts P. // *Int. Endod. J.* 2005. V. 38. P. 775–788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00999.x>
38. Grund E., Kroppenstedt R.M. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1990. V. 40. P. 5–11. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-1-5>
39. Wei Q., Ma L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
40. Brandel J., Humbert N., Elhabiri M., Schalk I.J., Mislin G.L.A., Albrecht-Gary A.-M. // *Dalton Trans.* 2012. V. 41. P. 2820. <https://doi.org/10.1039/c1dt11804h>
41. Abdelaziz A.A., Kamer A.M.A., Al-Monofy K.B., Al-Madboly L.A. // *Microb. Cell Fact.* 2022. V. 21. P. 262. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01988-x>
42. Brodhagen M., Henkels M.D., Loper J.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 1758–1766. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1758-1766.2004>
43. Esposito R., Speciale I., De Castro C., D'Errico G., Russo Krauss I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 5395. <https://doi.org/10.3390/ijms24065395>
44. Gogineni V., Chen X., Hanna G., Mayasari D., Hammann M.T. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2020. V. 73. P. 490–503. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-0321-6>
45. Masson F., Lemaitre B. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020. V. 84. P. e00089-20. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00089-20>
46. Olofsson T.C., Butler È., Markowicz P., Lindholm C., Larsson L., Vásquez A. // *Int. Wound J.* 2016. V. 13. P. 668–679. <https://doi.org/10.1111/iwj.12345>
47. Varijakzhan D., Loh J.-Y., Yap W.-S., Yusoff K., Seboussi R., Lim S.-H.E., Lai K.-S., Chong C.-M. // *Marine Drugs*. 2021. V. 19. P. 246.

- <https://doi.org/10.3390/md19050246>
48. Abd-Elgawad M.M.M. // *Life*. 2022. V. 12. P. 1360.
<https://doi.org/10.3390/life12091360>
 49. Bassols A., Costa C., Eckersall P.D., Osada J., Sabrià J., Tibau J. // *Proteomics Clin. Appl.* 2014. V. 8. P. 715–731.
<https://doi.org/10.1002/prca.201300099>
 50. Heinritz S.N., Mosenthin R., Weiss E. // *Nutr. Res. Rev.* 2013. V. 26. P. 191–209.
<https://doi.org/10.1017/S0954422413000152>
 51. Espinosa-Gongora C., Larsen N., Schønning K., Fredholm M., Guardabassi L. // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0160331.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160331>
 52. Chlebicz A., Śliżewska K. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2018. V. 15. P. 863.
<https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
 53. Meurens F., Summerfield A., Nauwynck H., Saif L., Gerdts V. // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. P. 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>
 54. Gaskins H.R. // In: *Swine Nutrition* / Eds. Lewis A.J., Southern L.L. CRC Press, 2000. P. 585–609.
<https://doi.org/10.1201/9781420041842>
 55. Crespo-Piazuelo D., Estellé J., Revilla M., Criado-Mesas L., Ramayo-Caldas Y., Óvilo C., Fernández A.I., Ballester M., Folch J.M. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 12727.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30932-6>
 56. Isaacson R., Kim H.B. // *Anim. Health Res. Rev.* 2012. V. 13. P. 100–109.
<https://doi.org/10.1017/S1466252312000084>
 57. Correa-Fiz F., Gonçalves dos Santos J.M., Illas F., Aragon V. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 6545.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43022-y>
 58. Correa-Fiz F., Fraile L., Aragon V. // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 404.
<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2700-8>
 59. Obregon-Gutierrez P., Aragon V., Correa-Fiz F. // *Pathogens*. 2021. V. 10. P. 697.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10060697>
 60. Correa-Fiz F., Neila-Ibáñez C., López-Soria S., Napp S., Martinez B., Sobrevia L., Tibble S., Aragon V., Migura-Garcia L. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 20354.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77313-6>
 61. Wang T., He Q., Yao W., Shao Y., Li J., Huang F. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1083.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01083>
 62. Dai H., Chen A., Wang Y., Lu B., Wang Y., Chen J., Huang Y., Li Z., Fang Y., Xiao T., Cai H., Du Z., Wei Q., Kan B., Wang D. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 852–858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003248>
 63. Matias Rodrigues J.F., Schmidt T.S.B., Tackmann J., Mering C. von // *Bioinformatics*. 2017. V. 33. P. 3808–3810.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx517>
 64. Wang F., Gai Y., Chen M., Xiao X. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 2759–2762.
<https://doi.org/10.1099/ijls.0.008912-0>
 65. Touchette D., Altshuler I., Gostinčar C., Zalar P., Raymond-Bouchard I., Zajc J., McKay C.P., Gunde-Cimerman N., Whyte L.G. // *ISME J.* 2022. V. 16. P. 221–232.
<https://doi.org/10.1038/s41396-021-01030-9>
 66. Raza M., Zhang Z.-F., Hyde K.D., Diao Y.-Z., Cai L. // *Fungal Diversity*. 2019. V. 99. P. 1–104.
<https://doi.org/10.1007/s13225-019-00434-5>
 67. Bennur T., Ravi Kumar A., Zinjarde S.S., Javdekar V. // *J. Appl. Microbiol.* 2016. V. 120. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1111/jam.12950>
 68. Xu D., Nepal K.K., Chen J., Harmody D., Zhu H., McCarthy P.J., Wright A.E., Wang G. // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2018. V. 3. P. 246–251.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.10.008>
 69. Vela A.I., Sánchez-Porro C., Aragón V., Olvera A., Domínguez L., Ventosa A., Fernández-Garayzábal J.F. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2446–2450.
<https://doi.org/10.1099/ijls.0.016626-0>
 70. Vela A.I., Arroyo E., Aragon V., Sanchez-Porro C., Latre M.V., Cerda-Cuellar M., Ventosa A., Domínguez L., Fernandez-Garayzabal J.F. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59. P. 671–674.
<https://doi.org/10.1099/ijls.0.006205-0>
 71. Fusco V., Quero G.M., Cho G.-S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Bockelmann W., Franz C.M.A.P. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 155.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>
72. Borgo F., Ballestriero F., Ferrario C., Fortina M.G. // *Ann. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 833–839.
<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0924-x>
73. Gaaloul N., Ben Braïek, O., Berjeaud J.M., Arthur T., Cavera V.L., Chikindas M.L., Hani K., Ghraïri T. // *J. Food Saf.* 2014. V. 34. P. 300–311.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12126>
74. Guarino A., Giannella R., Thompson M.R. // *Infect. Immun.* 1989. V. 57. P. 649–652.
<https://doi.org/10.1128/iai.57.2.649-652.1989>
75. Rieusset L., Rey M., Muller D., Vacheron J., Gerin F., Dubost A., Comte G., Prigent-Combaret C. // *Microb. Biotechnol.* 2020. V. 13. P. 1562–1580.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13598>
76. Kudo S., Morimoto Y.V., Nakamura S. // *Microbiology.* 2015. V. 161. P. 701–707.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.000031>
77. Dickerman A., Bandara A.B., Inzana T.J. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. P. 180–186.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003730>
78. Fuller A.T., Horton J.M. // *J. Gen. Microbiol.* 1950. V. 4. P. 417–433.
<https://doi.org/10.1099/00221287-4-3-417>
79. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 302.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
80. Tyurin A., Alferova V., Korshun V. // *Microorganisms.* 2018. V. 6. P. 52.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms6020052>
81. Björkroth K.J., Schillinger U., Geisen R., Weiss N., Hoste B., Holzapfel W.H., Korkeala H.J., Vandamme P. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 141–148.
<https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-141>
82. Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Manachini P.L. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 1717–1721.
<https://doi.org/10.1099/ijls.0.63190-0>
83. Jančić U., Gorgieva S. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 14. P. 76.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010076>
84. Muthukrishnan P., Chithra Devi D., Mostafa A.A., Alsamhary K.I., Abdel-Raouf N., Nageh Sholkamy E. // *J. Infect. Public Health.* 2020. V. 13. P. 1522–1532.
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.025>
85. Baranova A.A., Chistov A.A., Tyurin A.P., Prokhorova I.A., Korshun V.A., Biryukov M.V., Alferova V.A., Zakalyukina Y.V. // *Microorganisms.* 2020. V. 8. P. 1948.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8121948>
86. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 11th Ed. // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2015.
<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
87. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 25th Informational Supplement // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2015.
https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf
88. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Ed. // Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, USA, 2008.
https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf
89. Smith A.C., Hussey M.A. // *Gram Stain Protocols.* American Society for Microbiology, 2005.
<https://asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>
90. Glass N.L., Donaldson G.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 1323–1330.
<https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
91. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. // In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, Cambridge, Massachusetts, U.S., 1990. P. 315–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
92. Lane D.J., Stackebrandt E., Goodfellow M. // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic.* Wiley, Hoboken, New Jersey, U.S., 1991.
93. Glauert A.M. // *Practical Methods in Electron Microscopy.* North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London, 1974.
94. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T., Porto C., Bouslimani A., Melnik A.V.,

Meehan M.J., Liu W.-T., Crüsemann M., Boudreau P.D., Esquenazi E., Sandoval-Calderón M., Kersten R.D., Pace L.A., Quinn R.A., Duncan K.R., Hsu C.-C., Floros D.J., Gavilan R.G., Kleigrew K., Northen T., Dutton R.J., Parrot D., Carlson E.E., Aigle B., Michelsen C.F., Jelsbak L., Sohlenkamp C., Pevzner P., Edlund A., McLean J., Piel J., Murphy B.T., Gerwick L., Liaw C.-C., Yang Y.-L., Humpf H.-U., Maansson M., Keyzers R.A., Sims A.C., Johnson A.R., Sidebottom A.M., Sedio B.E., Klitgaard A., Larson C.B., Boya P C.A., Torres-Mendoza D., Gonzalez D.J., Silva D.B., Marques L.M., Demarque D.P., Pociute E., O'Neill E.C., Briand E., Helfrich E.J.N., Granatosky E.A., Glukhov E., Ryffel F., Houson H., Mohimani H., Kharbush J.J., Zeng Y., Vorholt J.A., Kurita K.L., Charusanti P., McPhail K.L., Nielsen K.F., Vuong L.,

Elfeki M., Traxler M.F., Engene N., Koyama N., Vining O.B., Baric R., Silva R.R., Mascuch S.J., Tomasi S., Jenkins S., Macherla V., Hoffman T., Agarwal V., Williams P.G., Dai J., Neupane R., Gurr J., Rodriguez A.M.C., Lamsa A., Zhang C., Dorrestein K., Duggan B.M., Almaliti J., Allard P.-M., Phapale P., Nothias L.-F., Alexandrov T., Litaudon M., Wolfender J.-L., Kyle J.E., Metz T.O., Peryea T., Nguyen D.-T., VanLeer D., Shinn P., Jadhav A., Müller R., Walters K.M., Shi W., Liu X., Zhang L., Knight R., Jensen P.R., Palsson B.Ø., Pogliano K., Lington R.G., Gutiérrez M., Lopes N.P., Gerwick W.H., Moore B.S., Dorrestein P.C., Bandeira N. // Nat. Biotechnol. 2016. V.34. P. 828–837.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

Antimicrobial Metabolites from Pig Nasal Microbiota

A. A. Baranova*, Y. V. Zakalyukina**, A. P. Tyurin*, V. A. Korshun*, O. A. Belozerova*,
 M. V. Biryukov***, A. V. Moiseenko* ***, S. S. Terekhov*, and V. A. Alferova*,#

Phone: +7 (926) 611-36-49; e-mail: alferovava@gmail.com

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
 ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Department of Soil Science, Lomonosov Moscow State University,
 ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

*** Department of Biology, Lomonosov Moscow State University,
 ul. Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

The mammal microbiome is considered an attractive source of bioactive compounds, including antibiotics. In this work, we studied cultivable microorganisms from the nasal microbiota of the Hungarian domestic pig (*Sus domesticus*). Taxonomy positions of the 20 isolated strains (18 bacteria, 1 yeast, 1 fungus) were determined by phylogenetic analysis, morphological study and a substrate utilization assay. The strains were subjected to antibiotic susceptibility testing and antimicrobial activity screening. *Pseudomonas aeruginosa* strain SM-11 was found to produce 4 known antibacterial molecules (pyocyanine, pyochelin, pyoluteorin, monorhamnolipid). Production of pyocyanine was induced by cocultivation with test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The results suggest that the mammal microbiota might serve as a valuable source of antimicrobial-producing strains, including those of rare taxa. Cocultivation techniques are promising approach to explore antimicrobials from silent biosynthetic gene clusters.

Keywords: respiratory tract, nasal microbiome, domestic pig, *Sus domesticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotics, ESEM