

больничной среды и с рук персонала акушерского стационара на фоне эпидемических ситуаций по ГСИ указывает на то, что циркулирующие штаммы (клоны) возбудителей были госпитальными. При этом в большинстве случаев госпитальные штаммы микроорганизмов оказались чувствительными к рабочим растворам дезинфектантов. Полученные результаты свидетельствуют, что резистентность возбудителей внутрибольничных ГСИ к дезинфицирующим средствам не является безусловным признаком госпитального штамма (клона) микроорганизмов, а совпадение профиля устойчивости возбудителей ГСИ к обеззараживающим препаратам — обязательным признаком наличия эпидемиологической связи между заболевшими.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинико-организационное руководство по организации работы акушерского стационара на основе новых технологий родовспоможения и инфекционного контроля. Российско-американское сотрудничество по здравоохранению. Проект «Мать и дитя», 2003.
2. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство Р 4.22643-10. М., 2010.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Метод. указ. МУК 4.2.1890-04.
4. Сергевнин В.И., Горовиц Э.С., Маркович Н.И. и др. Внутрибольничные гнойно-септические инфекции новорожденных и родильниц. Микробиологические и эпидемиологические аспекты. Пермь, 2010.
5. Сергевнин В.И., Гусманова П.С., Хохряков Р.В. и др. Стандартное эпидемиологическое определение случая и факторы риска внутрибольничной пневмонии доношенных и недоношенных новорожденных. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 2: 4-8.
6. Соломенный А.П., Максимов А.Ю., Мочалова Т.И. ПЦР-генотипирование госпитальных изолятов *Acinetobacter*. Журн. микробиол. 2004, 6: 26-30.
7. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций. Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерап. 2000, 2 (3): 82-95.

Поступила 12.02.13

Контактная информация: Сергевнин Виктор Иванович, д.м.н., проф., 614990, Пермь, ул. Петропавловская, 26, р.т. (342)233-40-15.

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

О.В.Рыбальченко, О.Г.Орлова*, В.М.Бондаренко*

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ЛАКТОБАЦИЛЛ

*Санкт-Петербургский государственный университет, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва

Приведены данные об антимикробных пептидах (АМП) лактобацилл, механизме их повреждающего действия, химической природе и генетическом контроле. Вне зависимости от источника выделения АМП лактобацилл, исключая реутерин, являются

ся пептидами с низкой молекулярной массой (4 — 6 kDa), отличаются друг от друга по химическому строению, чувствительности к температуре, действию различных ферментов, активны при нейтральном или чаще при низких значениях pH. Особое значение имеют механизмы, обеспечивающие тонкую регуляцию фенотипической экспрессии синтеза бактериоцинов и формирование иммунитета к их воздействию. Активность, а главное, уровень их продукции зависит от условий, в которых находятся эти бактерии, и контролируется трехкомпонентной системой регуляции. Эта система включает в себя сигнальный пептид (феромон), сенсорную гистидинкиназу, белок регулятор, активирующий транскрипцию. Устойчивость продуцента к действию собственного бактериоцина обеспечивается так называемым «белком иммунитета». АМП лактобацилл способны влиять на септообразование, синтез пептидогликана и белка, воздействовать на цитоплазматические мембраны, вызывая их дестабилизацию. Описаны этапы повреждающего действия: взаимодействие эффекторных пептидов с мембраной чувствительной клетки, позиционирование пептида в области соединения с белковым рецептором, погружение в сердцевину мембран спиральной структуры с образованием поры и истощением пула АТФ, приводящие к гибели клетки. Защиту от АМП определяют специфические белки, блокирующие формирование поры в мембране прямым связыванием повреждающих молекул или их рецепторов. Обсуждены перспективы дальнейших исследований роли антимикробных пептидов лактобацилл.

Журн. микробиол., 2013, № 4, С. 89—100

Ключевые слова: *Lactobacillus*, антимикробные пептиды, структура, секреция, генетический контроль, механизм повреждающего действия

O.V.Rybalchenko, O.G.Orlova*, V.M.Bondarenko*

ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF LACTOBACILLI

*St. Petersburg State University, Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Data on antimicrobial peptides (AMP) of lactobacilli, mechanism of their damaging effect, chemical nature and genetic control are presented. Regardless of the source of isolation AMP of lactobacilli except reuterin are peptides with low molecular weight (4 — 6 kDa), differ from each other by chemical structure, sensitivity to temperature, effect of various enzymes, active at neutral or more frequently low pH. Especially important are mechanisms ensuring fine regulation of phenotypic expression of bacteriocin synthesis and formation of immunity against their effect. Activity and most importantly the level of their production depend on the conditions in which these bacteria are present and are controlled by a three-component regulation system. This system includes signal peptide (pheromone), sensory histidine kinase, regulator protein activating transcription. Resistance of the producer to the effect of its own bacteriocin is ensured by the so called immunity protein. AMP of lactobacilli are able to influence septoformation, peptidoglycan and protein synthesis, affect cytoplasmic membranes causing their destabilization. Stages of this damaging effect are described: interaction of effector peptides with the membrane of the sensitive cell, positioning of the peptide in the region of connection with protein receptor, submerging into the core of the spiral structure membranes with the formation of a pore and exhaustion of ATP pool leading to cell death. Protection from AMP is determined by specific proteins blocking pore formation in the membrane by direct binding of damaging molecules or their receptors. Perspectives of further studies of the role of antimicrobial peptides of lactobacilli are discussed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2013, No. 4, P. 89—100

Key words: *Lactobacillus*, antimicrobial peptides, structure, secretion, genetic control, mechanism of damaging effect

Известно, что представители рода *Lactobacillus* способны синтезировать анти-микробные пептиды (АМП), относящиеся к бактериоциноподобным ингибирующим субстанциям, различающимся по молекулярной массе, спектру, типу секреции, механизмам антимикробного действия и генетическому контролю [1, 21, 26, 28, 40, 45, 49, 50, 53, 63]. Как правило, это комплексы, составной частью которых является белковый или полипептидный компонент, ответственный за бактерицидную активность. Наиболее подробно в настоящее время изучены АМП различных видов рода *Lactobacillus*, термостабильность и молекулярная масса которых варьируют в зависимости от степени их очистки, структурной конфигурации белковой составляющей, величины рН и ионной силы [21, 29 — 31, 43, 49, 50, 54].

Эффект антимикробных пептидов в условиях макроорганизма остается неясным. Однако продукция АМП индигенными симбионтными бактериями рассматривается в качестве признака высокой конкурентной способности пробиотического штамма, временно колонизирующего слизистую оболочку кишечника организма хозяина [2, 4, 10, 12, 19, 34, 60]. Следует отметить, что одним из первых препаратов, созданных на основе антимикробных пептидов бактерий *Lactococcus lactis*, явился низин, широко применяемый в качестве консерванта в пищевой промышленности [18, 52].

В настоящем обзоре представлен анализ современных данных об антимикробных пептидах, продуцируемых молочнокислыми бактериями рода *Lactobacillus*, используемыми для производства препаратов-пробиотиков.

Общие сведения об антимикробных пептидах. АМП, продуцируемые нормальной микрофлорой человека, давно привлекают к себе внимание как возможные вещества, необходимые для обеспечения адаптационных и пробиотических свойств интродукента при разработке препаратов-пробиотиков [2, 26, 34, 49, 57, 62, 63]. Ранее АМП были детально изучены у представителей семейства Enterobacteriaceae, в частности, у *Escherichia coli*, образующих бактериоциноподобные ингибирующие вещества [9]. АМП широко распространены и среди представителей родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* и др. [1, 15, 21, 26, 49, 63]. Бактериоцины с широким спектром антимикробного действия описаны у большого числа штаммов различных видов: *L.acidophilus* [28, 58, 64], *L.plantarum* [21, 23, 60], *L.salivarius* [17, 39], *L.amylolovor* [20], *L.sakei* [22], *L.helveticus* [29], *L.paracasei* [35], *L.bavaricus* [30], *L.fermentum* [7, 26] и др. Недавно у *Lactobacillus reuteri* обнаружен АМП с молекулярной массой 5305 Да. Выявленный АМП входит в состав мукозного белка Map (mucus adhesion-promoting protein), образующегося в результате деградации MapA компонента [13]. Его активность близка к антимикробным пептидам макроорганизма, таким как дефенсин, кателицидин или гистатин [51].

В зависимости от видовой принадлежности штамма-продуцента, химической природы и способа воздействия на чувствительную клетку-мишень, АМП принято подразделять на несколько групп: I (лантибиотики) — бактериальные полипептиды м.м. 5 Да, содержащие в своей структуре пострепликативно модифицированные аминокислоты, такие как лантонин, β -метиллантонин или ненасыщенные аминокислоты; 3 группы нелантибиотиков м.м. <10 кДа: Ia — педиоциноподобные пептиды, Ib — двухпептидные, Ic — не Ia, не Ib; далее III

группа пептидов м.м. >30 кДа и IV — циклические пептиды с молекулярной массой <10 кДа [4, 21, 28, 48].

По механизму действия бактериальные АМП подразделяют на несколько групп: (1) изменяющие мембранный потенциал клетки и увеличивающие проницаемость бактериальных мембран с формированием пор; (2) блокирующие белковый синтез в микробных клетках; (3) подавляющие репликацию ДНК и нарушающие процессы деления клетки [4, 27, 40, 47, 49, 63].

Бактериоциныпродуцирующие штаммы лактобацилл. Практически среди штаммов каждого вида лактобацилл можно обнаружить продуцирующие определенные бактериоциноподобные вещества. Такие штаммы лактобацилл описаны в работах отечественных и зарубежных исследователей [3, 4, 21, 46, 55, 57]. Обозначение бактериоциноподобных веществ было дано в соответствии с видовой принадлежностью штамма или наличием у лактобацилл плазмид, контролирующих их синтез [11, 22, 32, 35, 44, 47 — 50]. Известны штаммы *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, продуцирующие булгарицин (bulgaricin), *L.acidophilus* — лактоцин (lactocin), *L.plantarum* — плантарицин (plantaricin), *L.helveticus* — гелветицин (helveticin), *L.casei* — казеицин (caseicin), *L.curvatus* — курвацин (curvacin), *L.sakei* — сакацин (sakacin) [28, 48]. Описаны классы бактерицинов, связанные со штаммовой и видовой специфичностью бактерий-продуцентов [48].

Спектр антагонистической активности штаммов — продуцентов бактериоциноподобных веществ может варьировать от узкого до весьма широкого [1, 4, 21, 26, 47]. Так, бактериоцинпозитивные штаммы *L.acidophilus* и *L.rhamnosus*, выделенные у детей раннего возраста, проявили выраженную антагонистическую активность в отношении бактериальных клеток *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Clostridium perfringens* [46]. Антагонистическая активность бактерий *L.paracasei*, продуцирующих бактериоцин В-217, и плантарицинпозитивных штаммов *L. plantarum* ST23LD и ST341LD проявлялась в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* [27, 35]. Плантарицин низкой м. м. (1558 Да), синтезируемый бактериями *L.plantarum* Lp31, был активен в отношении тест-культур *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Pseudomonas* spp. [43].

Физико-химическая характеристика бактериоцинов. Одним из первых детально изучен бактериоцин, синтезируемый клетками *L.acidophilus*, обозначенный как лактоцин В, который на основании устойчивости к действию хлороформа и по физико-химическим свойствам был отнесен к протеину, биологическая активность которого подавлялась при воздействии протеиназы К [11]. При использовании гельфильтрации была определена м. м. лактоцина В — 6,0-6,5 кДа. Лактоцин В по ряду свойств был близок лактоцину 27 *L.helveticus*. Активный синтез обоих бактериоцинов наблюдали в раннюю стационарную фазу роста штамма-продуцента. Очищенный лактоцин В *L.acidophilus* проявил межвидовую антимикробную активность в отношении клеток *L.leichmanii*, *L.helveticus*, *L.lactis* и *L.delbrueckii* [11].

При изучении свойств бактериоцинов, синтезируемых бактериями *L.plantarum* ST23LD и ST341LD, выявлено, что бактерии *L.plantarum* ST23LD продуцируют бактериоцины двух типов: м. м. 3 и 14 кДа, достигающие максимального уровня спустя 18 ч роста. Высокий уровень бактериоцина, синтезируемого штам-

мом ST341LD, регистрировали на 2 ч раньше (после 16 ч роста). Отмечено, что под воздействием протеолитических ферментов происходило уменьшение активности бактерий, а добавление α -амилазы и воздействие температуры 121°C в течение 20 мин на активность бактериоцина не влияли. Активность бактериоцинов, синтезируемых *L.plantarum*, оставалась на том же уровне в течение 6 ч при $\text{pH} \leq 4,0$ [59].

В других исследованиях при отработке оптимальных условий синтеза плантарицина S бактериями *L. plantarum* LPCO10 показано влияние концентраций глюкозы и NaCl, кислорода и температуры в культуральной среде, а также размера инокулята на выход бактерицидной субстанции. Оптимальными условиями для продукции бактериоцина явились температура от 22 до 27°C, концентрация NaCl от 2,3 до 2,5%, фиксированная начальная 2% концентрация глюкозы в отсутствии O_2 . При таких условиях выход синтезированного бактериоцина был в $3,2 \times 10^4$ раза больше на литр культуральной жидкости, чем при получении очищенного плантарицина из культуральной жидкости, полученной при выращивании клеток лактобацилл по обычной методике [33]. Известно воздействие различных стрессовых факторов на рост бактерий *L. acidophilus* IBB801 и продукцию ими ацидофилина [64]. Описано влияние pH, фазы роста, температуры выращивания и других факторов на секрецию бактериоцинов лактобацилл [1, 30, 33].

Оригинальные исследования проведены с клетками *L.plantarum* NC8 при их выращивании в жидкой питательной среде в виде монокультуры и в условиях сокультивирования с некоторыми молочнокислыми бактериями. При предварительном воздействии автоклавированными клетками *Lactococcus lactis* MG1363 или живыми клетками *Pediococcus pentosaceus* FVB6 в условиях сокультивирования получен новый плантарицин NC8, состоящий из двух пептидов (α и β), комплементарность которых была необходима для проявления их активности. N-терминальная последовательность пептидов α и β отличалась от таковых у других известных бактериоцинов. М.м. α -цепи составила 3,6, а β -цепи — 4,0 кДа. Расшифровка нуклеотидных последовательностей секвенированных генов показала, что оба пептида продуцируются как предшественники бактериоцина, состоящие из 47 и 55 аминокислот соответственно, которые содержат N-терминальные последовательности глицинового типа. Зрелые α - и β -пептиды содержали 29 и 34 аминокислот соответственно [36].

Секреция бактериальных антимикробных пептидов. Как нами отмечено выше, посттрансляционно синтезированные пептиды обычно состоят из 30 — 60 аминокислот, антибактериальный спектр которых варьирует в различных диапазонах. Установлено, что сначала антимикробные пептиды транслируются как неактивные пропептиды (пребактериоцины), содержащие N-терминальную основную последовательность и C-терминальный пропептидный компонент. Во время посттрансляционных изменений основной пептид удаляется. В зависимости от типа бактериоцина некоторые аминокислоты в пропептидных компонентах, как это показано в отношении лантибиотиков, подвергаются либо дегидратации с последующим образованием тиюэфирного кольца для продукции лантомина, либо сразу через создание тиюэфирного кольца образуется цистин. Показано, что при росте на плотной питательной среде регуляция синтеза бактериоцинов у бактерий *L.plantarum* контролируется QS (Quorum Sensing) системой [37].

Оптимальные условия синтеза бактериоцинов подобного типа подробно описаны в литературе [26, 33].

Повреждающее действие антимикробных пептидов на клетки-мишени. Этапы повреждающего действия АМП на клетки-мишени наиболее полно описаны для лактоцинов А и В, продуцируемых *Lactococcus lactis*. Установлено, что лактоцины используют белки маннозо-фосфотрансферазной системы (man-PTS) в качестве рецепторов на поверхности клеток-мишеней. После прикрепления наблюдается транслокация бактериоцина внутрь поражаемой клетки с образованием в ее мембране пор, в результате чего происходит утечка содержимого клетки и, в конечном итоге, гибель. Предполагают, что образование пор происходит либо за счет олигомеризации молекул бактериоцина, либо за счет разрушения man-PTS [15, 48]. Следует отметить, что клетки, не способные к синтезу бактериоцинов, но обладающие к ним устойчивостью, обнаруживают в составе поверхностных структур некий вблизи расположенный протективный белок, не связанный непосредственно с компонентами man-PTS. Связывание протективного белка с белками-мишенями происходит только при наличии в питательной среде бактериоцина. Таким образом, происходит блокирование сайтов связывания белков-мишеней, что делает невозможным последующие процессы, приводящие к гибели клеток. Клетки, способные к синтезу бактериоцинов, в составе поверхностных структур имеют протективный белок, тесно связанный с рецептором для защиты клеток от гибели. Во всех описанных вариантах взаимодействий к рецептору с внутренней стороны мембраны присоединен специальный белок вне зависимости от состояния рецептора [25, 48].

Взаимодействие двухпептидных бактериоцинов, в частности, плантарицина А, и мембраны клетки начинается с адгезии отдельных молекул АМП к фосфолипидам мембраны. Молекулы плантарицина А выстраиваются в линейную структуру, что вызывает перегруппировку молекул липидов мембраны с образованием замкнутого бислоя. Плантарицин А проникает в клетку, а образовавшиеся при этом в мембране щели способствуют увеличению ее проницаемости и приводят к дисбалансу электролитов и, в конечном итоге, к гибели клетки [15, 25, 48].

В настоящее время выявлены существенные различия в спектрах действия бактериоцинов лактобацилл различных видов, а также возможность формирования штаммовой устойчивости к их действию. Оценка антимикробного эффекта бактериоцинов осложнена также способностью ряда штаммов лактобацилл к продукции одновременно несколько типов АМП [28].

В наших работах выявлена способность *L.acidophilus* D75, *L.plantarum* 8PA-3 и *L.fermentum* 97, продуцирующих антимикробные пептиды, вызывать ультраструктурные изменения клеток *Shigella flexneri*, гемолизинпродуцирующих изолятов *Escherichia coli*, энтерогеоморфических *E.coli* O157:H7, энтерооксигенных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Candida albicans* [5, 6, 7]. При использовании трансмиссионной электронной микроскопии выявлены особенности межклеточных взаимодействий при совместном культивировании штаммов бактериоцинпродуцирующих лактобацилл и чувствительных к их антагонистическому действию клеток указанных условно патогенных бактерий. Установлено, что ответная реакция различных клеток-мишеней на воздействие антимикробных метаболитов лактобацилл проявлялась на двух уровнях: популяционном и кле-

точном. На популяционном уровне изменялось соотношение различных морфологических типов клеток, увеличивалась доля инволюционных, лизированных и покоящихся бактерий. При этом интенсивность выявленных ультраструктурных изменений в клетках тест-культур коррелировала с величиной зоны подавления роста при исследовании этих микроорганизмов культуральными методами. На электронно-микроскопическом уровне показано, что антагонистическое воздействие лактобацилл приводило к морфофункциональным нарушениям в клетках-мишенях, проявляющихся в деструктивных изменениях, о которых свидетельствовала характерная разреженность цитоплазмы и разрушение клеточных компартментов [6-8]. Долгое время оставалось неизвестным, что происходит при этом в клетках самих бактерий-антагонистов, например, лактобацилл. Электронно-микроскопические исследования морфологических изменений бактериоциногенных культур *L. plantarum* 8РА и *L. fermentum* 97 при совместном выращивании с клетками-мишенями условно патогенных бактерий показали значительные отличия в ультраструктурной организации клеток лактобацилл, выращенных в монокультуре или совместно с другими микроорганизмами. Наряду с лизисом и переходом в покоящееся состояние части клеток в популяции лактобацилл обнаружено специфическое дифференцирование клеток-антагонистов, проявляющееся в увеличении толщины клеточной стенки и образовании на ее поверхности дополнительных защитных слоев и глобул, электронограммы которых представлены в [8].

Устойчивость бактериальных клеток к собственному бактериоцину. Следует отметить, что такие процессы, как транслокация молекул через цитоплазматическую мембрану и образование собственной защиты против гомологичных бактериоцинов, происходят опосредованно благодаря специфическим протеинам. Посттрансляционные модификации приводят к тому, что молекулы бактериоцинов могут либо высвобождаться в окружающую среду, либо оставаться в периплазматическом пространстве микробных клеток. Повреждающее действие пептидов опосредовано электростатическим взаимодействием их эффекторных эпитопов с мембранами чувствительных бактериальных клеток-мишеней. Лиганд-рецепторное взаимодействие ведет к транслокации спиральной структуры С-конца домена пептида в глубь мембраны с образованием поры, что, в конечном итоге, приводит к гибели клетки. Антибактериальная активность в отношении чувствительных грамположительных и грамотрицательных клеток-мишеней связана с дестабилизацией клеточных мембран [27, 48].

Устойчивость (иммунность) бактериальных клеток к собственному бактериоцину подробно изучена на модели антимикробного пептида AcH, структурные гены которого локализованы на плазмиде pWHE 92, переданной в клетки *L. plantarum*. Устойчивость клеток лактобацилл к действию антимикробного пептида связана с функцией *imm* генов, при этом структурные, регуляторные и гены иммунности собраны в одном опероне [25, 53].

Генетический контроль синтеза АМП. Генетические исследования показали, что структурный и регуляторный гены, контролирующие синтез бактериоцинов, могут входить в состав хромосомы или генома плазмид [22, 32, 53]. Так, у бактерий *L. plantarum* C11 выявлены 5 оперонов, содержащие *pln* гены, вовлеченные в продукцию антимикробных пептидов [23]. Авторам удалось показать, что экспрессия *pln* генов, контролирующих синтез плантарицинов, регулируется так называемой

феромон-сигнальной системой. Пептид-феромон (PlnA) инициирует синтез анти-микробных пептидов через активацию гистидинпротеинкиназы (PlnB) и двух регуляторов: PlnC (активирующий) и PlnD (ингибирующий) процесса синтеза. Все регулирующие промотеры содержат пару прямых повторов, необходимых для образования сайтов включения генов plnC и plnD. В этой работе показано, что феромон запускает на ранней стадии индукции саморегулирующую систему, включающую 4 гена: plnABCD [23].

Бактерии другого штамма *L. plantarum* CO10 синтезируют бактериоцины двух типов: плантарицин S и T. Активность плантарицина S также ассоциируется с двумя пептидами — α и β [56]. При клонировании оперона, кодирующего синтез плантарицина S, выявлены гены plsA и plsB, кодирующие α и β антимикробные пептиды соответственно. Нуклеотидные последовательности генов plsA и plsB транслируются в качестве предшественников плантарицина S, который содержит N-терминальную основную последовательность двойного глицинового типа [56]. Бактерии отечественного производственного штамма *L. plantarum* 8PA-3 синтезируют также плантарицины двух типов, детерминируемые хромосомой. Анализ секвенирования ДНК генома *L. plantarum* 8PA-3 выявил наличие полного локуса, размером около 20 тыс. п.н., содержащего гены, кодирующие синтез плантарицинов EF and NC8. Локус pln *L. plantarum* 8PA-3 оказался гомологичен pln кластеру *L. plantarum* J51 [61].

Приведенные генетические исследования демонстрируют, что синтез анти-микробных пептидов у бактерий рода *Lactobacillus* является сложным процессом, регулируемым поэтапно: начальное образование пребактериоцина с последующей пострепликативной модификацией, зависящих от сигнальных путей, индуцируемых феромоном, и молекулярных механизмов экспрессии ряда генов.

Экспрессия генов бактериоцинов in vivo. В опытах на мышах при пероральном введении выявлена экспрессия 72 генов *L. plantarum* WCFS-1 [16]. Более того, в геноме бактерий *L. plantarum* WCFS-1 идентифицированы 8 генов, способных моделировать цитокиновый ответ дендритных клеток, 6 из которых вовлечены в продукцию бактериоцинов. При анализе трех полученных авторами мутантов с делециями по pln генам, иммуномодулирующий эффект сохранялся [41]. При пероральном введении добровольцам бактерии *L. plantarum* WCFS-1 длительно персистируют в желудочно-кишечном тракте [19]. Методами транскриптомики показана экспрессия в образцах двенадцатиперстной кишки 6 генов, сгруппированных в одном pln локусе, при этом экспрессия pln EF1-оперона вовлечена в синтез пептидов двух бактериоцинов и белка иммунитета к нему. Указанный оперон обнаружен у 34 из 40 штаммов *L. plantarum* [60]. На модели 1-, 14- и 28-суточных поросят показана экспрессия бактериоцинов, синтезируемых при колонизации тонкой и дистальных отделов толстой кишки бактериями *L. plantarum* 423 и 12-перстной кишки клетками *L. salivarius* 241. При этом в кишечнике отмечали подавление численности *Enterococcus faecalis* вводимыми бактериоцин-продуцирующими лактобациллами указанных штаммов [39]. Пероральное введение *L. salivarius*, продуцирующих АМП, защищает мышей при заражении летальными дозами *Listeria monocytogenes* [17]. Показано *in vivo* снижение популяционного уровня *E. coli* при терапии бактериоцинами молочнокислых бактерий [12].

Таким образом, бактерии рода *Lactobacillus* синтезируют антимикробные

пептиды, отличающиеся по физико-химическим свойствам, условиям секреции, спектрам и механизмам повреждающего действия, играющие определенную роль в обеспечении антагонистической и иммуномодулирующей активности интродукта. Приведенные данные следует учитывать при разработке новых лекарственных форм пробиотических препаратов на основе антимикробных пептидов.

Работа поддержана грантом Санкт-Петербургского государственного университета № 0.37.123.2011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления. Журн. микробиол. 2003, 3: 109-113.
2. Бондаренко В.М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов. Фарматека. 2010, 2: 26-32.
3. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М., ГЭОТАР-Медиа, 2007.
4. Ермоленко Е.И., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г. Роль лактобацилл в обеспечении защитных свойств организма человека. СПб, Турусел, 2010.
5. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Вербицкая Н.Б. Проявление антагонистического действия бактериоциногенных *Lactobacillus acidophilus* на *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Proteus mirabilis*. Журн. микробиол. 2006, 7: 8-11.
6. Рыбальченко О.В., Вербицкая Н.Б., Бондаренко В.М. Ультраструктурные изменения в клетках *Shigella flexneri* при взаимодействии с бактериоциногенными бактериями *Lactobacillus acidophilus*. Журн. микробиол. 2006, 4: 50-53.
7. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Гуслева О.Р. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл. Журн. микробиол. 2010, 6: 66-70.
8. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Добрица В.П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб, ИИЦ ВМА, 2008.
9. Хмель И.А., Манохина И.М., Басюк Е.И. и др. Характеристика штаммов энтеробактерий, продуцирующих антибиотики широкого спектра действия — микроцины. Генетика. 1993, 5: 768-771.
10. Alander M., Korpela R., Salexin M. et al. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. Lett. Appl. Microbiol. 1997, 24 (5): 361-364.
11. Barefoot S.F., Chen Y.R., Hughes T.A. et al. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactocin B. Appl. Environ. Microbiol. 1994, 60: 3522-3528.
12. Belfiore C., Castellano P., Vignolo G. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. Food Microbiol. 2007, 24 (3): 223-229.
13. Bohle L.A., Brede D.A., Diep D.B. et al. Specific degradation of mucus adhesion-promoting protein (MapA) of *Lactobacillus reuteri* to an antimicrobial peptide. Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76 (21): 7306-7309.
14. Brarberg M.B., Nes J.F., Eijsink V.G. Feromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. Mol. Microbiol. 1997, 26 (2): 347-360.
15. Breukink E. A lesson in efficient killing from two-component lantibiotics. Mol. microbiol. 2006, 61 (2): 271-273.
16. Bron P.A., Grangette C., Mercenier A. et al. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. J. Bacteriol. 2004, 186: 5721-5729.
17. Corr S.C., Li Y., Riedel C.U. et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104 (18): 7617-7621.

18. Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 2006, 16: 1058-1071.
19. De Vries M.C. Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract. Netherlands, Wageningen, 2006.
20. De Vuyst L., Callewaert R., Crabbe K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology.* 1996, 142: 817-827.
21. Diep D.B., Nes I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in grampositive bacteria. *Curr. Drug Targets.* 2002, 3: 107-122.
22. Diep D.B., Axelsson L., Grefsti C. et al. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology.* 2000, 146: 2155-2160.
23. Diep D.B., Straume D., Kjos M. et al. An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides.* 2009, 30: 1562-1574.
24. Drider D., Fimland G., Hechard Y. et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006, 70 (2): 564-582.
25. Dzung B., Diep D.B., Skaugen M. et al. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104 (7): 2384-2389.
26. Eijsink V.G., Axelsson L., Diep D.B. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2002, 81: 639-654.
27. Hechard Y., Sahl H. G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from gram-positive bacteria. *Biochimie.* 2002, 84: 545-557.
28. Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995, 59 (2): 171-200.
29. Joerger M.C., Klaenhammer T.R. Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 1986, 167: 439-446.
30. Kaiser A.L., Montville T.J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, 75: 536-540.
31. Kawai Y., Ishi Y., Uemura K. et al. *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from feces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* 2001, 18 (4): 307-415.
32. Kouakou P., Dortu C., Dubois-Dauphin R. et al. Plasmid-associated bacteriocin production by *Lactobacillus* LMG21688 suppresses *Listeria monocytogenes* growth rebound in a food system. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, 306 (1): 37-44.
33. Leal-Sanchez M.V., Jimenez-Diaz R., Maldonado-Barragan A. et al. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(9): 4465-4471.
34. Lebeer S., Vanderleydes G., De Keersmaecker S.C. Genes and molecules of *lactobacillus* supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008, 72: 728-764.
35. Lozo J., Vukasinovic M., Strahinic I. et al. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* BGBUK2-16. *J. Food Prot.* 2004, 67 (12): 2727-2734.
36. Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., Jimenez-Diaz R. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *L. plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69 (1): 383-389.
37. Maldonado-Barragán A., Ruiz-Barba J.L., Jiménez-Díaz R. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 130 (1): 35-42.
38. Marco M.L., Bongers R.S., de Vos W.M. et al. Spatial and temporal expression of *Lactobacillus*

- plantarum genes in the gastrointestinal tracts of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73: 124-132.
39. Maré L., Wolfaardt G.M., Dicks L.M. Adhesion of *Lactobacillus plantarum* 423 and *Lactobacillus salivarius* 241 to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent in situ hybridization (FISH), and production of plantaricin 423 by cells colonized to the ileum. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100 (4): 838-845.
 40. McAuliffe O., Ross R. P., Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25: 285-308.
 41. Meijerink M., van Hemert S., Taverne N. et al. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS ONE.* 2005, 5 (5): e10632.doi:10.1371.
 42. Miller K.W., Ray P., Steinmetz T. et al. Gene organization and sequences of pediocin AcH/PA-1 production operons in *Pediococcus* and *Lactobacillus* plasmids. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, 40 (1): 56-62.
 43. Muller D.M., Carrasco M.S., Tonarelli G.G. et al. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 106 (6): 2031-2040.
 44. Muriana P.M., Klaenhammer T.R. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity of *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53: 553-560.
 45. Nissen-Meyer J., Rogne P., Oppegard C. et al. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* 2009, 10: 19-37.
 46. Ocaña V.S., Nader-Macías E.M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol. Biol.* 2004, 268: 347-353.
 47. Oppegard C., Rogne P., Emanuelsen L. et al. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 13 (4): 210-219.
 48. Oscariz J.C., Pissaboro A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 2001, 4: 13-19.
 49. Papagianni M. Ribosomally synthesis peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and application. *Biotechnol. Adv.* 2003, 21 (6): 465-499.
 50. Riley M.A., Wertz J.E. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Ann. Rev. Microbiol.* 2002, 56: 117-137.
 51. Rivas-Santiago B., Serrano C.J., Enrico-Moreno J.A. Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production. *Infect. Immun.* 2009, 77 (11): 4690-4695.
 52. Ross R.P., Galvin M., McAuliffe O. et al. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1999, 76: 337-346.
 53. Sablon E., Contreras B., Vandamme E. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Engineering Biotechnol.* 2000, 68: 21-60.
 54. Sahl H.G., Bierbaum G. Lantibiotic: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998, 52: 41-79.
 55. Simova E.D., Beshkova D.B., Dimitrov Zh.P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria from traditional Bulgarian dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 106 (2): 692-701.
 56. Stephens S.K., Floriano B., Cathcart D.P. et al. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64 (5): 1871-1877.
 57. Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker N.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 1976, 40: 722-756.
 58. Ten B.B., Minekus M., Van Der Vossen et al. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 1994, 77: 140-148.

59. Todorov S.D., Dicks L.M. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 2005, 45 (4): 312-322.
60. Troost F.J., van Baarlen P., Lindsey P. et al. Identification of the transcriptional response of human intestinal mucosa to *Lactobacillus plantarum* WCFS-1 in vivo. *BMC Genomics.* 2008, 9: 374.
61. Tsapieva A., Duplik N., Suvorov A. Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus* 8P-A3. *Beneficial Microbes.* 2011, 2 (4): 255-261.
62. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implication for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74 (16): 4985-4996.
63. Willey J.M., van der Donk W.A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Ann. Rev. Microbiol.* 2007, 61: 477-501.
64. Zamfir M., Grosa-Tudor S. Impact of stress condition on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB-801 and production of acidophilin 801. *J. Gen. Microbiol.* 2009, 55 (4): 277-282.

Поступила 12.02.13

Контактная информация: Рыбальченко Оксана Владимировна, д.б.н., проф.,
199106, С.-Петербург, Университетская набережная, 7/9, р.т. (812)230-79-62

© А.В.НАУМИК, 2013

А.В.Наумик

СПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРЕИМУЩЕСТВА, ПЕРСПЕКТИВЫ

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

При всем многообразии существующих методов выявления микроорганизмов остается нерешенным вопрос об ускоренной диагностике возбудителей тяжелых заболеваний, внутрибольничных инфекций и других микробных агентов, имеющих эпидемиологическое значение. В тех случаях, когда необходимо иметь результат исследования в течение кратчайшего срока, необходимы методы, не требующие специальной длительной подготовки исследуемого материала и выделения чистой культуры микроорганизмов. К ним относятся оптико-спектральные методы, среди которых наибольшего внимания заслуживает спектроскопия комбинационного рассеяния света, или рамановская спектроскопия, применению которой посвящен данный обзор. Возможность получения в течение нескольких минут информации о входящих в состав изучаемой пробы компонентах позволяет использовать рамановскую спектроскопию во многих отраслях биологии и медицины. Высокая специфичность метода основана на абсолютной уникальности спектров различных веществ и на практике составляет 96 — 97%, чувствительность — 95%. Полная автоматизация процесса, использование новейшего математического аппарата для считывания и предоставления результатов исследования позволяют избежать влияния человеческого фактора и повышают объективность полученных данных. Аналитическая надежность, своевременность получения результата и экономическая эффективность дают право рассматривать спектрометрию комбинационного рассеяния света в качестве перспективного универсального экспрессного метода в микробиологической диагностике.

Журн. микробиол., 2013, № 4, С. 100—110

Ключевые слова: микробиологическая диагностика, поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия (ПУРС), конфокальная микроскопия