

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Кассиров Илья Сергеевич

**Генетическая характеристика участка генома  
*Enterococcus faecium*, потенциально кодирующего  
бактериоцинподобный пептид LcbE**

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки 020400

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

профиль «Физиология и биомедицина»

Работа выполнена в отделе молекулярной микробиологии

НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН

Зав. лаборатории:

д.м.н., профессор Суворов А. Н.

Научный руководитель:

Старший преподаватель каф. микробиологии СПбГУ **Коженкова Елена Васильевна**

Научный консультант:

Научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ ИЭМ **Карасева Алена Борисовна**

Санкт-Петербург

2017

## Оглавление

Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы .....	6
1. 1. Характеристика рода <i>Enterococcus</i> .....	6
1. 2. Определение пробиотиков .....	6
1. 3. Использование штаммов рода <i>Enterococcus</i> в качестве пробиотиков .....	7
1. 4. Патогенность <i>Enterococcus spp</i> .....	8
1. 4. 1 Факторы вирулентности <i>Enterococcus spp</i> .....	8
1. 5. Приобретенная антибиотикорезистентность <i>Enterococcus spp</i> .....	10
1. 5. 1 Роль ARE, как возбудителей внутрибольничных инфекций .....	11
1. 6. Характеристика бактериоцинов .....	13
1. 6. 1 Классификация бактериоцинов .....	14
1. 6. 1 Генетика бактериоцинов на примере <i>entA</i> .....	15
1. 6. 2 Синтез бактериоцинов .....	16
1. 6. 3 Бактериоцины энтерококков .....	17
Глава 2. Материалы и методы .....	18
2. 1. Объекты исследования .....	18
2. 2. Условия культивирования штаммов <i>Enterococcus spp</i> .....	18
2. 3. Выделение ДНК .....	18
2. 4. Определение концентрации ДНК .....	18
2. 5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	19
2. 6. Линейный электрофорез в агарозном геле .....	20
2. 7. Измерение антимикробной активности методом диффузии в агар .....	20
2. 8. Определение природы антимикробной активности .....	21
2. 9. Создание рекомбинантной конструкции для последующего инсерционного мутагенеза .....	21
2. 9. 1 Выделение плазмиды .....	22
2. 9. 2 Создание рекомбинантной конструкции .....	22
2. 9. 3 Трансформация <i>E. coli</i> .....	22
Глава 3. Результаты исследования и обсуждение .....	24
3. 1. Описание гена <i>lcbE</i> .....	24
3. 1. 1 Распространенность гена <i>lcbE</i> и характеристика участка ДНК, содержащего данный ген .....	24
3. 2. Распространенность генов, кодирующих бактериоцины .....	27
3. 3. Антимикробная активность штаммов <i>Enterococcus faecium</i> .....	29
3. 4. Взаимосвязь наличия <i>lcbE</i> и антимикробной активности .....	30
3. 5. Природа антимикробной активности .....	31
3. 6. Взаимосвязь антимикробной активности и наличия бактериоцинов .....	32
3. 7. Создание рекомбинантной конструкции .....	33

Выводы .....	36
Список литературы .....	37

## Введение

Бактериоцины – это большое семейство секретируемых некоторыми бактериями пептидов, обладающих антимикробной активностью против близкородственных видов и родов бактерий [70]. В настоящий момент является актуальным поиск и изучение новых антимикробных веществ, в частности бактериоцинов, так как их возможно использовать в качестве консервирующих веществ в пищевой промышленности для предотвращения порчи изготавливаемых продуктов сапрофитными микроорганизмами.

Представляют интерес не только сами бактериоцины, но и продуцирующие их бактериальные штаммы, которые так же могут быть использованы в пищевой и фармацевтической промышленности в составе стартовых культур и пробиотических препаратов. Способность проявлять антагонистическую активность к патогенным бактериям является одним из определяющих свойств при выборе пробиотических штаммов [66].

Бактериоцины энтерококков в настоящее время исследованы довольно подробно, в особенности такие пептиды как EntA, EntB, EntX $\alpha$ / $\beta$ , L50A/B [6, 11, 14, 15, 37]. При исследовании полногеномного сиквенса штамма *Enterococcus faecium* L-3, который входит в состав пробиотического препарата «Ламинолакт» были обнаружены гены, кодирующие структурные единицы энтероцинов EntA, EntB, EntX $\alpha$  и EntX $\beta$ , а также гены, отвечающие за регуляцию синтеза этих бактериоцинов [40].

Кроме того, в составе оперона, отвечающего за синтез энтероцина A, у этого штамма присутствует ген *lcbE*, который потенциально кодирует бактериоциноподобный пептид с неизвестными на данный момент функциями. По данным биоинформатического анализа, продукт гена *lcbE* предположительно является низкомолекулярным пептидом, имеющим лидерную последовательность, заканчивающуюся двумя глицинами, характерную для бактериоцинов второго класса.

Для изучения функции данного гена требуется методом инсерционного мутагенеза получить штамм *Enterococcus faecium* с инактивированным геном *lcbE*. Для этого необходимо создать рекомбинантный вектор для проведения инсерционного мутагенеза, а также подобрать подходящий для данной процедуры штамм *E. faecium*. Так как продуктом экспрессии данного гена предположительно является антимикробный пептид, то способность штаммов *E. faecium* угнетать рост других бактерий может служить критерием сравнения при изучении фенотипических свойств мутантного и исходного штаммов.

В связи с этим была поставлена **цель**:

Охарактеризовать участок ДНК штаммов *Enterococcus faecium*, потенциально кодирующий бактериоциноподобный пептид *LcbE*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать коллекцию штаммов *Enterococcus faecium* на наличие гена *lcbE*, и генов, кодирующих бактериоцины: *entA*, *entB*, *EntX $\alpha$ / $\beta$* , *entP*.
2. Определить наличие и природу антимикробной активности коллекционных штаммов *Enterococcus faecium*.
3. Создать рекомбинантную конструкцию для инсерционного мутагенеза для выключения гена *lcbE*.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1. 1. Характеристика рода *Enterococcus*

Представители рода *Enterococcus* – грамположительные, каталазоотрицательные не спорообразующие факультативно анаэробные [8] фирмикуты, относящиеся к семейству *Enterococcaceae* (порядок *Lactobacillales*, класс *Bacilli*).

Представители рода *Enterococcus* способны выживать в широком диапазоне температуры (5-65°C), pH (4,5-10) и при высокой концентрации NaCl, что способствует их широкому распространению [25].

Они повсеместны, обитают в желудочно-кишечном тракте самых разнообразных организмов и составляют значительную часть микробиоты ЖКТ человека. Столь широкое распространение этих бактерий может означать, что энтерококки входили в состав микробиоты кишечника общих предков большого числа групп современных многоклеточных[51].

Помимо желудочно-кишечного тракта различные штаммы *Enterococcus spp.* могут быть обнаружены во множестве ферментированных продуктов: в сырах, в колбасах, где способствуют их созреванию и созданию ароматов [25].

### 1. 2. Определение пробиотиков

Согласно определению рабочей группы Всемирной Организации Здравоохранения, к пробиотикам относят живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина. У этого понятия существует множество определений, учитывающие различные нюансы этого понятия, к примеру: «Пробиотики – живые микроорганизмы, оказывающие при естественном способе введения положительное воздействие на физиологические, биохимические и иммунные реакции хозяина путем стабилизации и оптимизации структуры и функций его нормальной микробиоты» [2].

В состав большинства пробиотиков для человека входят *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.*, тогда как существует меньше информации об эффективности штаммов *Enterococcus spp* в качестве пробиотиков.

До начала использования какого либо штамма в качестве пробиотика, всегда тщательно проверяется его взаимодействие с нормальной микрофлорой, с патогенными микроорганизмами, и способность выживать после введения в организм хозяина [30].

### 1. 3. Использование штаммов рода *Enterococcus* в качестве пробиотиков

Полезные для человека свойства энтерококков - высокая антагонистическая активность в отношении патогенной микробиоты, участие в формировании и поддержании иммунитета, участие в нормальном пищеварении, противовоспалительные свойства, витаминобразование - определили возможность использования этих бактерий в медицине в качестве пробиотиков [1], предназначенных для лечения дисбактериоза и восстановления нормальной микробиоты кишечника.

Не стоит забывать и о других свойствах энтерококков: регуляции кишечного микробного гомеостаза, стабилизации функции желудочно-кишечного барьера [61], экспрессии бактериоцинов [49], индукции абсорбции клетками кишечника переваренных питательных веществ [67], иммуномодулирующих свойствах [62], способности ингибировать прокарциногенные ферменты и угнетения способности патогенных микроорганизмов колонизировать и инфицировать слизистую оболочку кишечника [32].

Штаммы, пригодные для промышленного производства пробиотических препаратов, подбираются в результате тщательного анализа их фенотипических и генетических свойств. Зачастую оптимальным выбором является смесь штаммов, которые могут относиться к разным родам и видам бактерий [68].

*E. faecium* и *E. faecalis* являются наиболее распространенными бактериями в желудочно-кишечном тракте человека, в то время как у животных преобладает *E. faecium* [25]. Эти микроорганизмы используются в качестве стартовых культур при изготовлении разнообразных пищевых продуктов, в качестве пробиотических культур и в сельскохозяйственных целях, например при производстве силоса [26].

Штаммы *Enterococcus spp.* использовались для лечения таких заболеваний человека, как индуцированная приемом антибиотиков диарея, воспалительных патологий, таких как синдром раздраженной толстой кишки (IBS, англ. Irritable Bowel Syndrome) [27]. *E. faecium* SF68 специально используется для лечения диареи у детей [71] и предотвращения диареи, вызванной антибиотикотерапией [71]. Более того, штаммы *Enterococcus spp.* используются для общего улучшения здоровья человека, для снижения уровня холестерина [36].

Хотя немногие исследователи изучали иммуномодулирующие свойства штаммов *Enterococcus spp.*, в настоящее время интерес к этим свойствам возрастает. Описано, что *E. faecium* L5 способен восстанавливать микробиоту, увеличивать экспрессию IL-10 и уменьшать экспрессию IL-8 в модели дисбактериоза крыс [66]. Кроме того, исследования *E. faecalis* СЕСТ 7121 и *E. faecium* JWS 833 продемонстрировали их способность усиливать продукцию цитокинов дендритными клетками у мышей [13].

Штаммы *E. faecium* имеют долгую историю безопасного использования в промышленных и сельскохозяйственных целях. Хотя пробиотические преимущества некоторых штаммов хорошо известны, появление энтерококков, ассоциированных с заболеваниями человека и обладающих множественной резистентностью к антибиотикам, вызывают обеспокоенность в отношении их использования в качестве пробиотиков. Также вероятность того, что гены устойчивости к противомикробным препаратам или гены, кодирующие факторы вирулентности, могут быть переданы другим бактериям, населяющим желудочно-кишечный тракт человека и животных, способствует недоверию к этой группе как потенциальным пробиотикам [26].

#### 1. 4. Патогенность *Enterococcus spp*

Не стоит забывать, что энтерококки, которые длительное время считались безвредными комменсалами, в последнее время все чаще ассоциируются с нозокомиальными инфекциями[24].

Энтерококки входят в число наиболее распространенных внутрибольничных патогенов. Было отмечено, что эти бактерии являются важнейшей причиной развития эндокардита, бактериемии, инфекций мочевыводящих путей, инфекций центральной нервной системы, внутрибрюшных и тазовых инфекций, а также они обладают множественной резистентностью к антибиотикам [46]. Было описано несколько факторов вирулентности *Enterococcus spp*, а количество антибиотико-резистентных энтерококков (ARE, англ., antibiotic-resistant enterococci), особенно ванкомицин-резистентных энтерококков (VRE, англ., vancomycin-resistant enterococci), увеличивается [26].

##### 1. 4. 1 Факторы вирулентности *Enterococcus spp*

Факторы вирулентности – структурные компоненты и продукты бактериальных клеток, участвующие в реализации инфекционного процесса. Типичными примерами факторов вирулентности *Enterococcus spp* являются агрегационное вещество, желатиназа, поверхностный белок *Esp*, экзополисахариды [26].

##### Агрегационное вещество

Агрегационное вещество (AS, англ., aggregation substance) представляет собой индуцируемый феромоном, поверхностный белок *E. faecalis*, который способствует образованию агрегатов во время бактериальной конъюгации[51]. В отличие от грамотрицательных бактерий, у грамположительных энтерококков конъюгация инициируется в ответ на секрецию клеткой-реципиентом низкомолекулярных сигнальных молекул, пептидов, которые были названы феромонами. Сигналы воспринимаются содержащим плазмиду донором. Конъюгация сопровождается образованием агрегатов. AS, выступает в



качестве адгезина, обеспечивающего межклеточный контакт [51]. Способность к агрегации может способствовать патогенезу энтерококковой инфекции через различные механизмы. AS может вызывать аллергические реакции в организме хозяина при наличии данного белка на поверхности клетки *Enterococcus faecalis*, так как AS обладает антигенными свойствами. Также клетки *Enterococcus spp.*, продуцирующие AS, устойчивы к фагоцитированию, путем ингибирования продукции ROS (ROS, англ., reactive oxygen species) внутри макрофагов. AS увеличивает гидрофобность поверхности клеток *Enterococcus faecalis*, что может вызывать задержку холестерина в фагосомах и предотвращать или замедлять их слияние с лизосомальными везикулами [52]. Наконец, этот фактор патогенности способствует переносу плазмид, содержащих детерминанты резистентности к антибиотикам, внутри популяции *Enterococcus spp.* До сих пор AS найден только в штаммах *E. faecalis*. Его распространенность среди штаммов, изолированных из пищевых продуктов, по-видимому, высока [28].

#### Желатиназа

Желатиназа (*Gel*) представляет собой внеклеточную цинк-зависимую металлопротеазу, участвующую в гидролизе желатина, коллагена, гемоглобина и других белков [65]. Связь между энтерококковой протеазой и вирулентностью была впервые предложена в 1975 г. Голдом, который обнаружил, что, продуцирующий желатиназу, выделенный из ротовой полости человека, штамм *E. faecalis* вызывал образование кариеса у крыс, в то время как не-протеолитические штаммы этого не делали [65]. Секвенирование гена протеазы (*gelE*) в *E. faecalis* показало, что *Gel*, который обычно продуцируется нозокомиальными, фекальными и клиническими изолятами *Enterococcus spp.*, является фактором вирулентности энтерококков, по крайней мере, при исследовании перитонита у мышей [64]. Продукция *Gel* среди штаммов *E. faecalis*, выделенных из пищевых продуктов, является широко распространенной. Однако даже при наличии гена *gel* может отсутствовать синтез желатиназы [22].

#### Поверхностный белок Esp

Ассоциированный с клеточной оболочкой белок Esp (ESP, англ., extracellular surface protein) был впервые описан у клинического штамма *E. faecalis* MMH594) [63]. Ген *esp* необычайно крупный, состоящий из 5622 нуклеотидов. Первичный продукт трансляции состоит из 1873 аминокислот и имеет теоретическую молекулярную массу приблизительно равную 202 кДа. Исследования распространения этого поверхностного белка выявили его высокую встречаемость у *E. faecalis* [68]. ESP, как полагают, играет роль в адгезии, а также в избегании иммунного ответа хозяина. Распространенность ESP в штаммах, изолированных из пищевых продуктов отличается для *E. faecium* и *E. faecalis*.

#### Внеклеточные полисахариды энтерококков

*E. faecalis* и *E. faecium* могут обладать внеклеточным полисахаридом, который является мишенью для опсонических антител [38]. Опсонофагоцитарное уничтожение используют в качестве теста *in vitro* для обнаружения защитного иммунного ответа против бактериальных патогенов [20], поскольку все антитела, которые обеспечивают антибактериальный иммунитет, являются опсоническими. Сравнили один пробиотический штамм *E. faecalis* с набором клинических изолятов и обнаружили, что 89% клинических штаммов были менее восприимчивы к опсонин-опосредованному фагоцитозу, с использованием сыворотки кролика [39]. Кроме того, опсонофагоцитарное уничтожение считается важным тестом для оценки безопасности штаммов *Enterococcus spp* [39].

### 1. 5. Приобретенная антибиотикорезистентность *Enterococcus spp*.

Использование антимикробных препаратов в кормах для животных, в качестве стимуляторов роста и в стартерных культур для ферментации пищевых продуктов, создало большие резервуары переносимых детерминант устойчивости к антибиотикам, которыми обладают штаммы *Enterococcus spp*, по пищевой цепи [58]. Эти бактерии способны приобретать детерминанты устойчивости через передачу генов, опосредованную плазмидами и транспозонами. Анализ энтерококков выявил огромную пластичность их генома. Как у *E. faecalis*, так и у *E. faecium*, приобретенные элементы могут составлять до 25% генома [35, 46]. Более того, показано, что конъюгация между энтерококками может давать трансконъюгирующие штаммы с гибридными геномами. То есть большие фрагменты (до 800 т.п.н.) хромосомной ДНК могут быть перенесены из штамма-донора в штамм-реципиент. Перенос зависит от присутствия плазмид, чувствительных к феромону. Перенос плазмидной ДНК на хромосому может протекать путем рекомбинации между гомологичными последовательностями на плазмиде и хромосоме [48].

К приобретенной резистентности относится устойчивость к ампициллину (особенно у *E. faecium*), тетрациклинам, макролидам, аминогликозидам (высокий уровень), хлорамфениколу, триметоприму, хинолонам и стрептограминам (у *E. faecium* и родственных видов), а также устойчивости к гликопептидам (Ванкомицин). VRE обладают генами устойчивости *vanA*, *vanB*, *vanD* и *vanE* [43]. На основе наличия данных генов, уровне и типе резистентности к антибиотикам создали классификацию VRE. Ампициллин, ванкомицин и гентамицин являются наиболее клинически значимыми антибиотиками для лечения инфекций, вызванных штаммами *Enterococcus spp* с множественной устойчивостью к антибиотикам. Следует отметить, что широкое использование ванкомицина неуклонно повышает количество VRE в течение последних двух десятилетий и, следовательно, процент инвазивных нозокомиальных энтерококков, демонстрируя устойчивость к ванкомицину

высокого уровня [23]. Однако устойчивость к антибиотикам как таковая не может объяснить вирулентность энтерококков. К сожалению, VRE также обладают высокой устойчивостью ко всем стандартным анти-энтерококковым препаратам [45], и, следовательно, VRE представляют собой серьезную группу риска. Поэтому был разработан метод выявления резистентных к гликопептидам генотипов *Enterococcus spp* с помощью полимеразной цепной реакции [21].

Гликопептид-резистентные энтерококки фенотипически и генотипически гетерогенны. Из шести различных фенотипов VRE [50], фенотипы *VanA* и *VanB* имеют самую высокую клиническую значимость, поскольку они чаще всего наблюдаются у двух доминирующих видов энтерококков *E. faecalis* и *E. faecium* [12]. Штаммы типа *VanA* после приобретения транспозона Tn1546 или близкородственных мобильных генетических элементов демонстрируют высокую индуцибельную резистентность к ванкомицину и тейкопланину [5]. Штаммы *VanB* - типа демонстрируют переменные уровни индуцируемой устойчивости к ванкомицину [5]. ARE широко распространены в пищевых продуктах. Они были найдены в мясных, молочных и готовых к употреблению пищевых продуктах и даже в штаммах *Enterococcus spp*, используемых в качестве пробиотиков [28, 33]. Обнаружены приобретенные признаки резистентности к ряду антибиотиков в энтерококках, изолированных из пищевых продуктов, по всей Европе. Однако в целом эти штаммы не проявили устойчивости к клинически значимым антибиотикам [29]. Ряд авторов подчеркивает роль, которую играют ARE и, особенно, VRE, в качестве возможных естественных резервуаров детерминант устойчивости к антибиотикам, которые через пищевые продукты распространяются в окружающей среде [33]. Возможна взаимосвязь между использованием некоторых антибиотиков в животноводстве и колонизация людей ARE через пищевую цепь. По соображениям безопасности решающим критерием для проверки рациональности использования конкретного антибиотика является отсутствие возможности переноса резистентности к антибиотикам от *Enterococcus spp* к другим бактериальным штаммам, которые могут быть использованы в качестве совместно культивируемых или стартовых культур в пищевых продуктах [53, 69].

#### 1. 5. 1 Роль ARE, как возбудителей внутрибольничных инфекций

С начала 1990-х годов в больницах в Соединенных Штатах, а теперь также в других частях мира идет увеличение заболеваний, связанных с *E. faecium* и вызвано это расширением использования ванкомицина и антибиотиков широкого спектра действия. Действительно, число инфекций, вызванных ванкомицинорезистентными энтерококками (VRE) в больницах США, увеличилось с 9 820 в 2000 году до 21 352 в 2006 году; Более того, *E. faecium* сейчас так же часто является причиной внутрибольничных инфекций, как *E. faecalis*. Эти данные имеют

первостепенное клиническое значение, так как инфекции, вызываемые *E. faecium* является значительно более сложными для лечения по сравнению с заболеваниями, вызываемыми *E. faecalis*. Например, в Соединенных Штатах процент изолятов *E. faecium*, которые были устойчивы к ванкомицину, возрос от 0% до 80 % за период с 1980-х годов до 2007 года. Напротив, только ~ 5% изолятов *E. faecalis* устойчивы к ванкомицину [4].

Также энтерококки могут длительное время существовать на различных поверхностях, включая медицинское оборудование, спинки кроватей и дверные ручки. Они устойчивы к высоким температурам, хлору и некоторым спиртовым препаратам, что объясняет их широкое распространение в больничных условиях [4].

Во всем мире устойчивость бактерий к антибактериальной терапии резко возросла за последние несколько лет. Антибиотики стремительно теряют свою эффективность из-за сочетания самолечения, нерационального назначения и использования этих терапевтических средств, что приводит к развитию мультирезистентных штаммов бактерий, некоторые из которых устойчивы ко всем доступным антибиотикам. Таким образом, необходимость разработать возможные альтернативы антибиотикам становится крайне важна, для защиты и развития общественного здоровья [47].

Европейский центр по контролю и профилактике заболеваний (ECDC англ., European Centre for Disease Prevention and Control) сообщает, что ежегодно в Европе 25000 человек умирают от инфекций, вызванных несколькими резистентными штаммами бактерий. Борьба с этими микроорганизмами обходится обществу в 1,5 млрд. евро в год, в виду дополнительных затрат на медицинские услуги и обусловленные заболеваниями потери производительности труда [10].

Устойчивость к антибиотикам достигла высокого уровня, все большее число штаммов проявляют антибиотикорезистентность. Так же становится распространённым явление множественной резистентности к антибиотикам, то есть штамм является устойчивым к широкому спектру антибиотиков.

Таким образом, становится актуальным обнаружение новых антимикробных агентов с различными механизмами действия, а также новых методов для лечения и профилактики инфекций. Разработка новых антибиотиков является трудной и дорогостоящей задачей, так как из всех синтезируемых молекул лишь 0,01% проявляет антимикробную активность. К тому же чаще всего производство этих новых веществ имеет высокую себестоимость, они часто оказываются высокотоксичными для организма и сложны в синтезе [55].

Крайне важно, чтобы осуществляли контроль над использованием антибиотиков. Это позволит замедлить распространение антибиотикорезистентности в популяциях бактерий. Не менее важно иметь так же альтернативные стратегии, которые позволят бороться с

устойчивыми штаммами в окружающей среде. Одной из возможных стратегий является использование бактериоцинов [57].

## 1. 6. Характеристика бактериоцинов

Бактериоцины – это большое семейство секретируемых некоторыми видами бактерий пептидов, обладающих антимикробной активностью против других штаммов того же вида или близкородственных видов [70]. Однако отмечается рост числа бактериоцинов, обладающих антимикробной активностью широкого спектра действия [41].

В прошлом десятилетии возрос интерес к исследованию бактериоцинов, в особенности бактериоцинов, которые синтезируются родом *Lactococcus*, так как была обнаружена возможность использовать их в качестве естественных консервантов и терапевтических антибиотиков[34].

Бактериоцины по своей природе часто устойчивы к высоким температурам и известны своей активностью в широком диапазоне рН. Эти антимикробные пептиды также не имеют цвета, запаха и вкуса, что еще больше повышает их потенциальную полезность при использовании для консервации продуктов. Несмотря на длительную историю использования бактериоцинов, не было сообщений о появлении резистентных к ним бактерий. Одна из возможных причин заключается в том, что бактериоцины являются пептидами, который образуют поры в мембране чувствительных бактерий даже при чрезвычайно низких концентрациях. Они также легко разлагаются протеолитическими ферментами из-за их белковой природы. Так же они являются удобным объектом для биоинженерии, с использованием которой можно увеличить их активность, усилить специфичность по отношению к целевому микроорганизму [56].

На рисунке 1 представлены основные механизмы действия бактериоцинов. Бактериоцины, ингибирующие рост грамположительных бактерий, воздействуют на клеточную оболочку чувствительных микроорганизмов. Низин и некоторые другие бактериоцины класса I ингибируют синтез пептидогликана, связываясь с липидом II, что приводит к образованию пор. Бактериоцины класса II, такие как лактокоцин А, связываются с порообразующей рецепторной маннозо-фосфотрансферазной системой (Man-PTS). Многие бактериоцины, которые ингибируют рост грамотрицательных бактерий (и, следовательно, их необходимо транспортировать через внешние и, во многих случаях, внутренние мембраны), препятствуют метаболизму ДНК, РНК и белка. Например, микроцин В17 (MccB17) ингибирует ДНК-гиразу, MccJ25 ингибирует РНК-полимеразу, а MccC7-C51 ингибирует аспартил-тРНК-синтетазу. Существуют исключения, такие как MccE492, которые функционируют через образование пор [17].

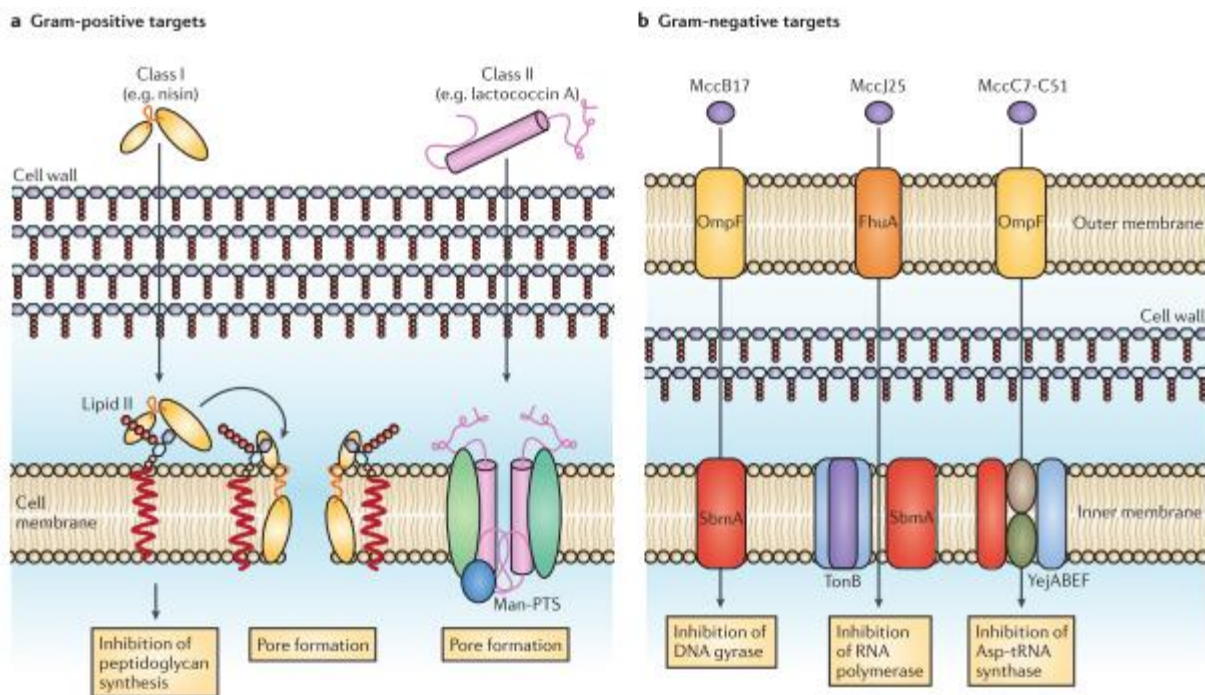


Рис. 1. Механизмы действия бактерицинов. А – механизм действия бактерицинов против грамположительных бактерий: нисин и некоторые другие бактерицины класса I ингибируют синтез пептидогликана, связываясь с липидом II, и образуют поры; бактерицины класса II, такие как лактокоцин А, связываются с порообразующей рецепторной маннозо-фосфотрансферазной системой (Man-PTS). В - механизм действия бактерицинов против грамотрицательных бактерий: Микроцин В17 (MccB17) ингибирует ДНК-гиразу, MccJ25 ингибирует РНК-полимеразу, а MccC7-C51 ингибирует аспартил-тРНК-синтетазу. [17].

### 1. 6. 1 Классификация бактерицинов

Существует множество различных классификаций бактерицинов. В соответствии с одной из современных классификаций бактерицины делят на два класса. Некоторые представители этих классов и их характеристики приведены в таблице 1.

Таблица 1. Структурные особенности бактерицинов класса I и класса II [17]

Группа	Особенности	Пример
Класс I (модифицируемые)		
Бактерицины типа MccC7-C51	Ковалентно присоединен к остатку аспарагиновой кислоты на С-конце	MccC7-C51
Лассо пептиды	Имеют структуры лассо	MccJ25
Линейные азол- или азолин-содержащие пептиды	Обладают гетероциклами, но не другими модификациями	MccB17

Лантибиотики	Обладают лантиониновыми мостиками	Низин, планоспорицин, мерсацидин, актогардин, мутацин 1140
Линаридины	Линейная структура и дегидратированные АК	Ципемидин
Протеазины	Содержат множественные гидроксирования, эпимеризации и метилирования	Политеонамид А
Сактибиотики	Содержат соединения серы с $\alpha$ атомам углерода	Субтилозин А, турицин CD
Пателламид подобные цианобактины	Обладают гетероциклами и подвергаются макроциклизации	Пателламид А
Анцикламид подобные цианобактины	Циклические пептиды, состоящие из протеиногенных аминокислот с присоединениями пренила	Анацикламид А10
Фиопептиды	Содержит центральное пиридиновое, дигидропиридиновое или пиперидиновое кольцо, а также гетероциклы	Тиострептон, нокатиоцин I, GE2270 А, филипомидин
Ботромицины	Содержат макроциклический амидин, декарбоксилированный тиазол на С-конце и углерод-метилированные аминокислоты	Ботромицин А2
Гликоцины	Содержат S-связанные гликопептиды	Субланцин 168
Класс II (не модифицируемые или циклические)		
IIa пептиды (педиоцин PA-1 подобные)	Обладают консервативным мотивом YGNGV (в котором N представляет любую аминокислоту)	Педиоцин PA1, энтероцин CRL35, карнобактериоцин BM1
IIb пептиды	Для активности требуются два немодифицированных пептида	ABP118, лактоцин F
IIc пептиды	Циклические пептиды	Энтероцин AS-48
IId пептиды	Немодифицированные, линейные, непедокиноподобные, однопептидные бактериоцины	MccV, MccS, эпидермицин NI01, лактокоцин А
IIe пептиды	Содержат серин-богатую С-концевую область с нерибосомной модификацией сидерофора	MccE492, MccM

### 1. 6. 1 Генетика бактериоцинов на примере *entA*

Оперон *entA* состоит из следующих элементов: структурные гены, кодирующие препептид; гены устойчивости к бактериоцину; гены ABC транспортера и белков,

способствующие секреции бактериоцинов. В процессе секреции бактериоцин становится активным. При выделении бактериоцина на его N-терминальном домене удаляется лидерная последовательность, а сам экспорт определяется ABC - транспортерами [31]. Бактериоцины производятся в условиях стресса, который может быть вызван повышенной плотностью популяции бактерий в естественных условиях, когда уменьшается скорость роста бактерий [7].

Гены, отвечающие за синтез бактериоцина и за устойчивость к нему, как правило, организованы в опероны и могут быть расположены на хромосомах, на мобильных генетических элементах: транспозонах или плаزمидах [18]. Бактериоцин-продуцирующие штаммы должны защищать себя от токсического действия их собственного бактериоцина [18]. Это происходит за счет производства специфических белков иммунитета. Гены, кодирующие белки иммунитета, находятся в непосредственной генетической близости к другим структурным и генами процессинга бактериоцина. Часто структурный ген бактериоцина и ген иммунитета могут быть расположены на одном и том же опероне [16].

На рисунке 2 представлена структура бактериоцинового оперона *entA* штамма *Enterococcus faecium* L-3 [40]. Ген *entA* кодирует препептид бактериоцина А, *entI* – ген, кодирующий белок иммунитета к энтероцину А, *entF* – ген, кодирующий фактор индукции экспрессии бактериоцина А, *entK* и *entR* – гены, кодирующие двухкомпонентную регуляторную систему, ? – ген с неизвестной функцией, *lcbE* – ген потенциально кодирующий бактериоцин, *entT* и *entD* – гены, кодирующие ABC транспортеры [54].

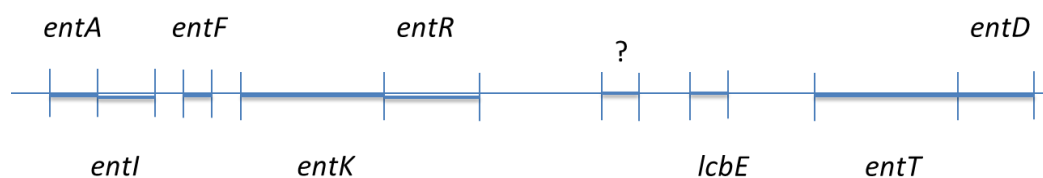


Рис. 2. Схема структуры оперона *entA* у *Enterococcus faecium* L-3

### 1. 6. 2 Синтез бактериоцинов

Продукция бактериоцинов широко распространена среди бактерий. Было высказано предположение, что большинство бактериальных видов синтезируют бактериоцины [60]. Это связано с тем, что их биосинтетические механизмы относительно просты и часто связаны с мобильными генетическими элементами, такими как сопряженные транспозоны или плазмиды [59]. Как отмечалось ранее, бактериоцины представляют собой синтезированные на рибосомах пептиды. Бактериоцины обычно синтезируются как биологически неактивные препептиды, которые включают пептид с лидерным N-концом, присоединенным к C-концевому препептиду [17]. Лидерная последовательность выполняет следующие функции: (i) служит местом узнавания и определяет локализацию бактериоцина в клетке, (ii) защищает



штамм-продуцент, сохраняя бактериоцин в неактивном состоянии, когда он находится внутри штамма-продуцента, и (iii) взаимодействует с пропептидным доменом, чтобы обеспечить его подходящую конформацию для взаимодействия с ферментами [42]. Биосинтез бактериоцинов первого класса начинается с трансляции препептида, который состоит из лидерного пептида и модифицируемого пропептидного фрагмента. Затем препептид подвергается модификации, после чего модифицированный препептид транслоцируется через цитоплазматическую мембрану, а лидерный пептид расщепляется протеолитическими ферментами. Бактериоцины класса II синтезируются как неактивный препептид, который обычно содержит характеристический сайт взаимодействия с протеолитическими ферментами с двумя остатками глицина [19]. В отличие от бактериоцинов первого класса, бактериоцины класса II не подвергаются обширной посттрансляционной модификации. После трансляции препептида обрабатывается специфическими ферментами, чтобы отрезать лидерный пептид и секретировать его во внеклеточное пространство с помощью ABC-транспортера [19].

### 1. 6. 3 Бактериоцины энтерококков

Энтерококки способны производить энтероцины А, В, L50A/B, Р, Q, X $\alpha$ / $\beta$  которые проявляют активность против *Listeria sp.*, *Clostridium sp.* и *Staphylococcus aureus* [9]. Большую часть бактериоцинов производят *E. faecalis* и *E. faecium* [44]. Антимикробная активность бактериоцинов обусловлена пермеабиллизацией клеточной мембраны чувствительных клеток. К примеру, энтероцин Р действует на чувствительные клетки по следующей схеме: пептиды бактериоцинов при контакте с клеточной мембраной образуют спиральную структуру, которая встраивается в мембрану, создавая поры. Возникающая пора приводит к утечке ионов К<sup>+</sup>, диссипации мембранного потенциала и ингибирование поглощения аминокислот, что приводит к гибели клеток [19, 31].

## Глава 2. Материалы и методы

### 2. 1. Объекты исследования

В работе использовали 43 штамма *E. faecium*, полученные в рамках проекта по исследованию аутопробиотиков в г. Санкт-Петербург от пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Штаммы не имели детерминант патогенности *esp* и *sprE* (сериновая протеаза) [3], и также был использован пробиотический штамм *E. faecium* L-3, выделенный из препарата Ламинолакт (Авена).

### 2. 2. Условия культивирования штаммов *Enterococcus spp*

Коллекцию *Enterococcus faecium* поддерживали, выращивая на среде Тода-Хьюита (ТНВ) следующего состава: настой говяжьего сердца - 500 г/л; пептический перевар животной ткани - 20 г/л; глюкоза - 2 г/л; NaCl - 2 г/л; Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 2 г/л; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 2,5 г/л; конечное значение рН (при 25°C) 7,8 ± 0,2.

Для культивирования штаммов *E. coli* использовали среду Лурия-Бертани (LB) (NaCl - 5 г/л; триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л; рН 7,0).

Для получения ночных культур штаммы размораживали и пересевали в жидкую питательную среду так, чтобы концентрация исходной суспензии в ней была 1%.

Для длительного хранения коллекцию штаммов *Enterococcus faecium* замораживали при температуре -80°C.

### 2. 3. Выделение ДНК

Бактериальные клетки, выращенные в течение какого-то времени, осаждали в центрифуге марки Eppendorf в течение 2 минут при 13 000 об/мин, затем удаляли супернатант. Добавляли 100 мкл дистиллированной воды, полученную суспензию бактериальных клеток тщательно перемешивали на шейкере. Затем суспензию кипятили 10 минут в термоблоке марки Biosan, модель Bio TDB-120 при 99 °C. Полученный препарат снова центрифугировали при тех же условиях. Производили отбор верхней фракции супернатанта, содержащей ДНК для дальнейшего использования. Для хранения ДНК замораживали при -18°C и хранили не больше одного месяца.

### 2. 4. Определение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра Qubit (Invitrogen) согласно инструкции.

## 2. 5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проходила по стандартной схеме: денатурация ДНК, отжиг праймеров, элонгация. Температура отжига праймеров рассчитывали по формуле:  $T=2*(A+T)+4*(G+C)$ .

В качестве реакционной смеси для ПЦР объемом 20 мкл использовали следующие реагенты: 14,8 мкл воды, 2 мкл буфера, 1 мкл смеси нуклеотидов dNTP, 0,2 мкл Taq-полимеразы и по 0,5 мкл каждого праймера из пары. Также добавляли 20 мкл минерального масла, так как используемый амплификатор Терцик фирмы ДНК-Технологии не имеет горячей крышки. Исследуемую ДНК добавляли в объеме 2 мкл.

ПЦР начиналась с инкубации проб в течение 10 минут при 93°C, так как использовали Hot-Taq полимеразу, для активации которой необходим предварительный нагрев. Затем проводили 30 циклов ПЦР со следующими параметрами: денатурация ДНК при 93°C в течение 30 секунд, отжиг праймеров проводили 20 секунд при температуре от 51 до 58 °C, в зависимости от количества Г - Ц пар в праймерах, элонгация происходила при 72°C в течение 30-60 секунд в зависимости от размера конечного продукта.

Для постановки ПЦР использовали праймеры из таблицы 2, сконструированные с использованием полногеномного сиквенса штамма *Enterococcus faecium* L-3 [40].

Таблица 2. Наборы праймеров для определения наличия бактериоцинодирующих генов/участков ДНК вокруг гена *lcbE*

Аmplифицируе мый ген/участок ДНК	Названи е прайме ров	Нуклеотидная последовательность праймеров	Сайты рестрикц ии	Размер фрагме нта н. п.
<i>entA</i>	entA1	AAAGAGACACAACCTTATCTAT GGG	-	136
	entA2	CACSTATAGACATTCCTGCAAT AC	-	
<i>entB</i>	entB1	ACTCTAAAAGGAGCGAGTTT	-	496
	entB2	AGAGCTGGGGATGAAATATT	-	
<i>entXα</i>	entXα1	TTAAGCTTCACTCCTACGCTTA CC	-	134
	entXα2	ATCGGATCCTCTAATGATAGTC TT	-	
<i>entXβ</i>	entXβ1	CTACGTCCACCATTCCAA	-	356
	entXβ2	ATGCAAAATGTAAAAGAAGT	-	

<i>entP</i>	entP1	GCTACGCGTTCATATGGTAAT	-	130
	entP2	GTCCCATACCTGCCAAACC	-	
lcbE196	lcbE1	CGAATTCAGCACCTAATAAA GCTCCAC	GAATT C	196
	lcbE2	GCATATTAACACAAAAAC AACA	-	
lcbE394	lcbE1	CGAATTCAGCACCTAATAAA GCTCCAC	GAATT C	394
	lcbE3	CGGATCCGAGGCAATAATGCT TGGGGA	GGATC C	
lcbE904	lcbE4	AGAATTCGTATGGTGGGAAGAT GCGAAA	GAATT C	904
	lcbE3	CGGATCCGAGGCAATAATGCT TGGGGA		

## 2. 6. Линейный электрофорез в агарозном геле

Для разделения фрагментов ДНК использовали 1,5% агарозный гель. Для его приготовления в 100 мл буфера TAE (Трис – 24,22 г, ЭДТА – 1,862 г, уксусная кислота – 8,96 мл, вода – 73,3 г) добавляли 1,5 г агарозы. В качестве интеркалирующего красителя использовали бромистый этидий марки Helicon. Молекулярный размер продукта устанавливали при сравнении с маркером длин ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder фирмы Thermo Fisher Scientific.

Для электрофореза использовали камеру марки Bio-Rad, источник питания марки Bio-Rad. Для оценки результатов 1,5% гель фотографировали под УФ - светом с использованием камеры VersaDoc.

## 2. 7. Измерение антимикробной активности методом диффузии в агар

Для измерения антимикробной активности использовали среду Мюллера-Хинтена Mueller Hinton Broth (мясной настой 300г/л; гидролизат казеина 17,5 г/л; крахмал 1,5г/мл; pH7.3±0,2) с добавлением 1,5% агара.

В качестве индикаторов использовали: *Listeria ivanovii* DSM 20750, *Listeria innocua* DSM 20649, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactia*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Enterococcus faecalis* 27, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Среду расплавляли, давали ей остыть до 40°C. К 20 мл среды добавляли разбавленную в 1000 раз индикаторную культуру, перемешивали и заливали в чашки Петри. Чашки оставляли застывать при комнатной температуре в течение 30 минут. В стерильных условиях в агаре делали лунки диаметром 6 мм при помощи пластикового наконечника от дозатора. После этого чашки Петри размещали в термостате при 37°C на 30 минут для подсушивания среды. Затем стерильно в лунки добавляли по 50 мкл культур штаммов *E. faecium*. Чашки Петри оставляли на полчаса при комнатной температуре, чтобы суспензия впиталась в агар. Полученные чашки Петри инкубировали в течение 12 часов в термостате при 37°C. На следующий день оценивали диаметр зоны отсутствия роста индикаторных культур вокруг лунок.

## 2. 8. Определение природы антимикробной активности

Природу антимикробной активности определяли двумя способами. Каждый исследуемый штамм *Enterococcus faecium* выращивался на среде ТНВ в объеме 5 мл в течение 12 часов. Пробирки центрифугировали в течение 25 минут при 5 тыс. об/мин. Полученные супернатанты *Enterococcus faecium* переносили в три микропробирки по 1 мл. Супернатант из первой микропробирке не подвергали никаким обработкам. Супернатант из второй пробирки кипятили в течение 10 минут. Супернатант из третьей пробирки подвергали обработке протеиназой -  $\alpha$ -химотрипсином в конечной концентрации 0,2 мкг/мл. Затем методом диффузии в агар определяли изменение зоны угнетения роста индикаторной культуры.

Для определения рН супернатанта клеточной культуры *Enterococcus faecium* использовали индикаторную бумагу фирмы Экрос.

## 2. 9. Создание рекомбинантной конструкции для последующего инсерционного мутагенеза

Для создания рекомбинантной конструкции использовали интегративную плазмиду p7ERM(B) (рисунок 3). Данный вектор имеет маркер устойчивости к эритромицину. Размер плазмиды приблизительно 2723 п. н.

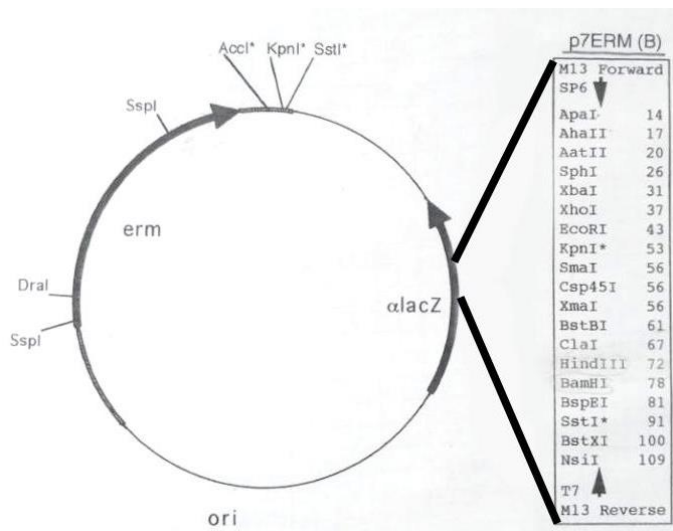


Рис. 3. Плазмида p7ERM(B)

### 2. 9. 1 Выделение плазмиды

Культуру *E. coli*, содержащую плазмиду p7ERM(B), выращивали на шейкере в течение 18 часов при температуре 37°C на среде LB, содержащей эритромицин в концентрации 700 мкг/мл.

Плазмиду выделяли с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit и Plasmid Midiprep фирмы Qiagen.

### 2. 9. 2 Создание рекомбинантной конструкции

Амплификаты получали, используя праймеры из таблицы 2 методом ПЦР. Амплификат lcbE394 получали при использовании праймеров lcbE1 и lcbE3. Амплификат lcbE904 получали при использовании праймеров lcbE4 и lcbE3.

Полученный амплификат очищали с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit фирмы Qiagen.

Рестрикцию амплификатов и вектора производили согласно инструкции набора FastDigest Restriction Enzymes. В данной реакции использовали следующие ферменты рестрикции: EcoRI и HindIII.

Лигирование амплификата с вектором проводили согласно инструкции Rapid DNA Ligation Kit фирмы ThermoScientific.

### 2. 9. 3 Трансформация *E. coli*

Выращивали культуру *E. coli JM109* в 5 мл LB бульона. К 5 мл свежего LB добавляли ночную культуру *E. coli JM109* так, чтоб конечная концентрация культуры в суспензии была равна 1 %. Выращивали в течение 1,5-2 часов, периодически измеряя оптическую плотность суспензии клеток *E. coli*. Когда оптическая плотность достигала показателя 0,3-0,4, из полученной жидкой культуры отбирали пробы по 1,5 мл в микропробирки и

центрифугировали в течении 2-3 минут на скорости 5000 об/мин. После удаления супернатанта, добавляли 1 мл 0,1М раствора CaCl<sub>2</sub>. Оставляли либо на 1,5 часа во льду, либо на ночь при +4°C. Полученную смесь центрифугировали, осадок ресуспендировали в смеси, состоящей из 187,5 мкл 0,1М CaCl<sub>2</sub> и 62,5 мкл воды. После вносили 20 мкл лигазной смеси в каждую пробирку и инкубировали 1 час во льду. После инкубации микропробирки помещали на 2 минуты в водяную баню с температурой 42°C и сразу после этого на 2-10 минут в лед. Затем добавляли в микропробирки 1 мл LB бульона без антибиотика и инкубировали 1 час при 37°C. После всех этих процедур культуру *E. coli* высевали на чашки Петри с эритромицином с концентрацией 700 мкг/мл. Колонии, которые выросли на среде с антибиотиком, отбирались для последующей проверки на наличие рекомбинантной плазмиды.

## Глава 3. Результаты исследования и обсуждение

### 3. 1. Описание гена *lcbE*

Пептид, кодируемый исследуемым геном, имеет следующую аминокислотную последовательность:

MHIKNTKTTFILSSEELKNIQGGSAVGLGTTFSGATAGVKLCSAGGPYAIAACGVGGALL  
GAGFSMWTGA.

Данный пептид имеет лидерную последовательность, которая оканчивается двумя глицинами: MHIKNTKTTFILSSEELKNIQGG. Согласно данным, представленным в базе данных BLAST, пептид LcbE является потенциальным бактериоцином второго класса.

Ген *lcbE* входит в оперон, ответственный за синтез и секрецию бактериоцина *entA*.

#### 3. 1. 1 Распространенность гена *lcbE* и характеристика участка ДНК, содержащего данный ген

Методом ПЦР было определено наличие гена *lcbE* у штаммов *Enterococcus faecium*, и были охарактеризованы фрагменты ДНК, содержащие этот ген с использованием трех пар праймеров, сконструированных на основе полногеномного сиквенса штамма *Enterococcus faecium* L-3 [40].

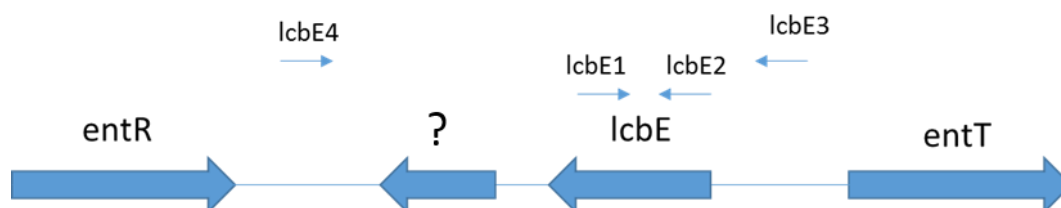


Рис. 4. Схема участка ДНК, содержащего ген *lcbE*. Стрелками обозначены участки специфичные к праймерам. ? – ген с неустановленной функцией. Праймеры lcbE1 и lcbE2 использовались для амплификации фрагмента размером 196 п. н. Праймеры lcbE1 и lcbE3 использовались для амплификации фрагмента размером 394 п. н. Праймеры lcbE4 и lcbE3 использовались для амплификации фрагмента размером 904 п. н.

Электрофореграммы ампликонов, полученных с использованием указанных на схеме праймеров, приведены на рисунках 5-7.



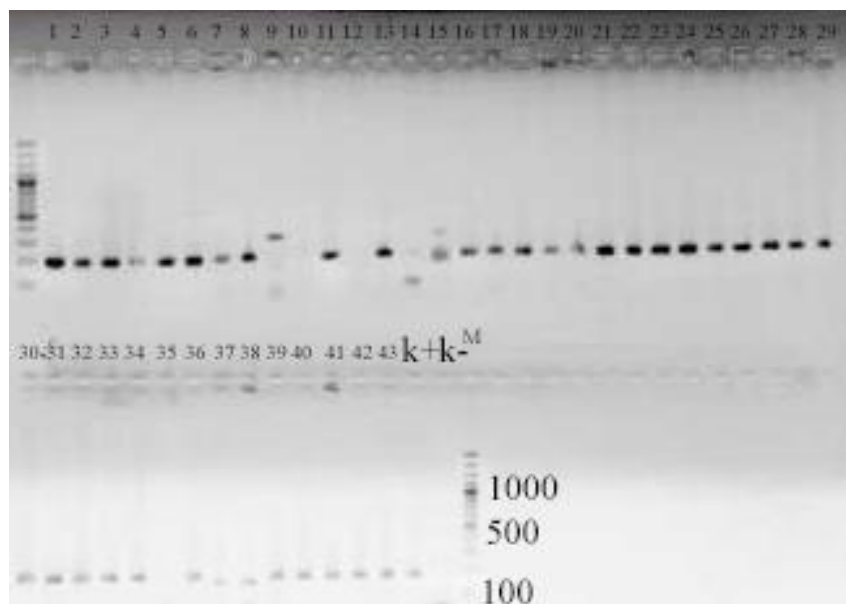


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при использовании праймеров IcbE1 и IcbE2. М - маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К- -отрицательный контроль, ожидаемый размер ампликона – 196 н.п.

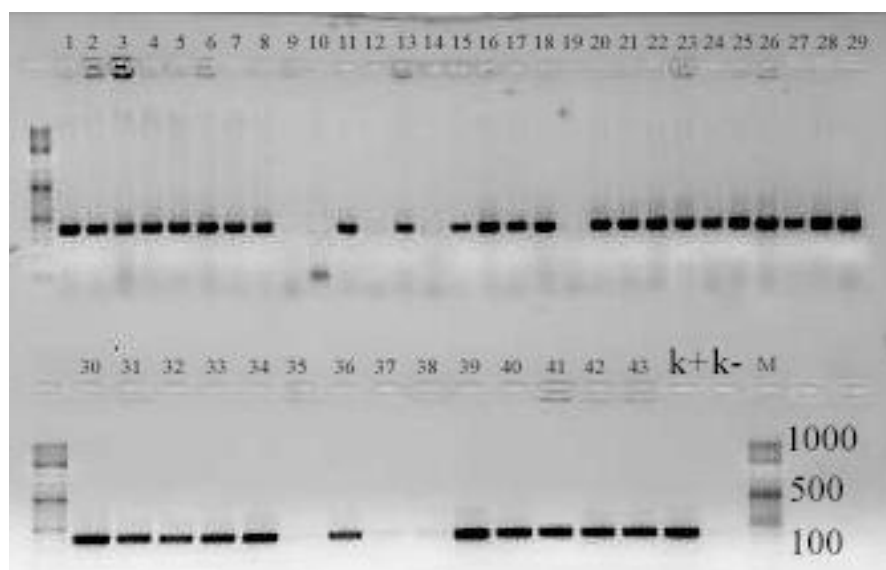


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при использовании праймеров IcbE1 и IcbE3. М - маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К- -отрицательный контроль, ожидаемый размер ампликона – 394 н.п.

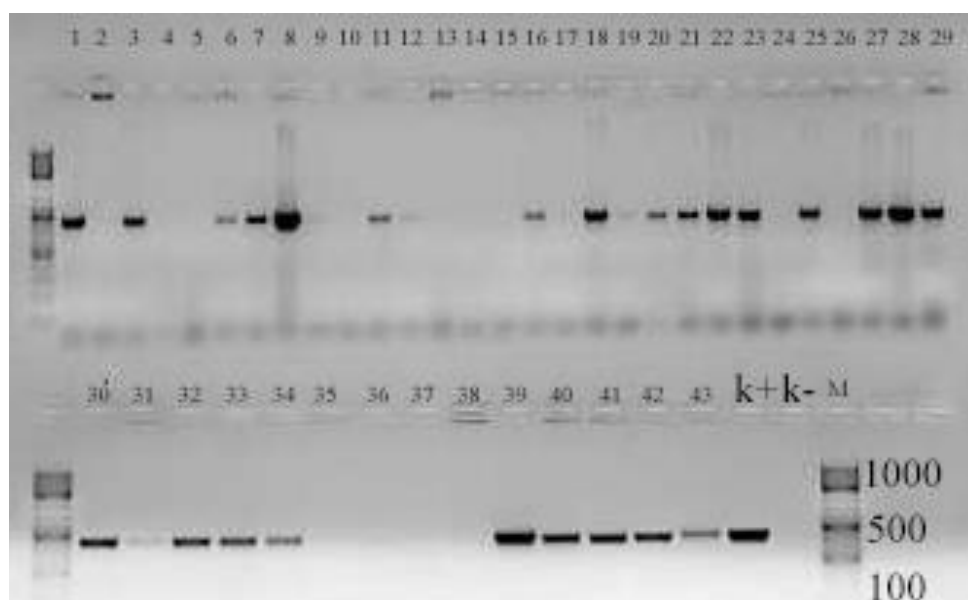


Рис. 7. Электрофореграмма продуктов ПЦР полученных при использовании праймеров IcbE4 и IcbE3. М - маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К - -отрицательный контроль, ожидаемый размер ампликона – 904 н.п

В таблице 3 представлены результаты ПЦР на наличие ампликонов.

Таблица 3. Характеристика участка ДНК, содержащего ген *IcbE*

Штамм \ Амплификат	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Icb196	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Icb394	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Icb904	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Штамм \ Амплификат	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Icb196	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Icb394	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Icb904	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

Штамм \ Амплификат	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	L3
Icb196	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Icb394	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Icb904	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Из данной таблицы видно, что амплификация фрагмента ДНК длиной 196 п.н. (*lcbE*196) обнаружена у 39(88,6%) штаммов. Ампликоны длиной 394 п.н. (*lcbE*394) и 904 п.н. (*lcbE*904) были получены для 36 (81,8%) и 27(61,4%) штаммов соответственно.

При использовании праймеров, специфичных к участкам ДНК за пределами данного гена, было получено, что число штаммов, для которых получены ампликоны длиной 394 и 904 п.н., меньше, чем число штаммов, у которых обнаружен фрагмент ДНК, длиной 196 п.н.

Можно сделать вывод, что участок ДНК вокруг гена *lcbE* различается у разных штаммов *Enterococcus faecium*.

### 3. 2. Распространенность генов, кодирующих бактериоцины

Методом ПЦР было определено наличие генов, кодирующих бактериоцины у коллекционных штаммов *Enterococcus faecium*, в качестве положительного контроля использовался *Enterococcus faecium* L-3, так как у него были обнаружены все исследуемые гены, кодирующие бактериоцины (*entA*, *entB*, *entX*), за исключением *entP*. В качестве примера полученных данных ниже приведены результаты ПЦР при использовании праймеров к генам *entB* (рис. 9) и *entXa* (рис.10).

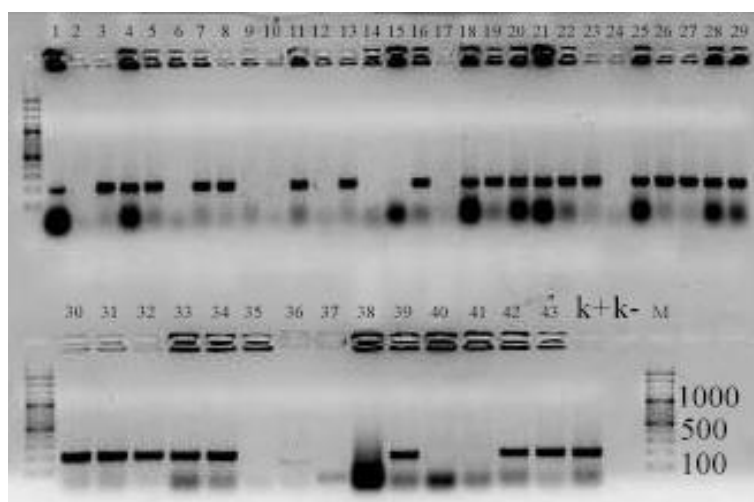


Рис. 8. Электрофореграмма продуктов ПЦР при использовании праймеров к гену *entB*. М - маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К- - отрицательный контроль, ожидаемый размер ампликона – 496 н.п

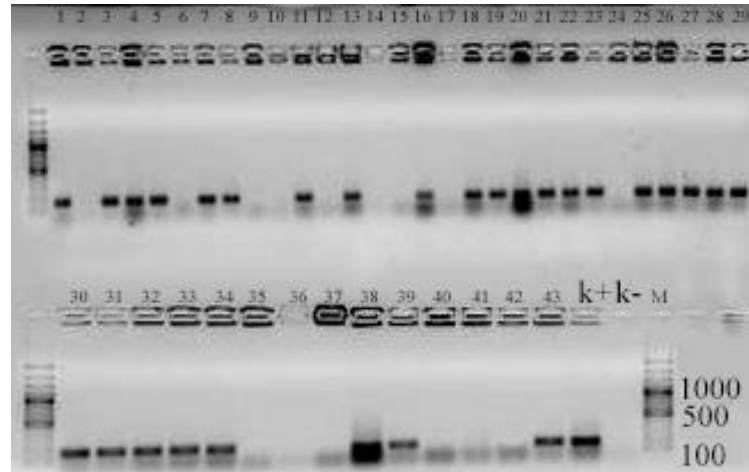


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов ПЦР при использовании праймеров к гену *entXα*. М - маркер длин фрагментов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К - - отрицательный контроль, ожидаемый размер ампликона – 134 н.п.

Таблица 4. Наличие генов, кодирующих бактериоцины у коллекционных штаммов

Ген \ Штамм	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>entA</i>	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>entB</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>entXα</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>entXβ</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>entP</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Ген \ Штамм	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<i>entA</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>entB</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>entXα</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>entXβ</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>entP</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Ген \ Штамм	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	L3
<i>entA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
<i>entB</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>entXα</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>entXβ</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>entP</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-

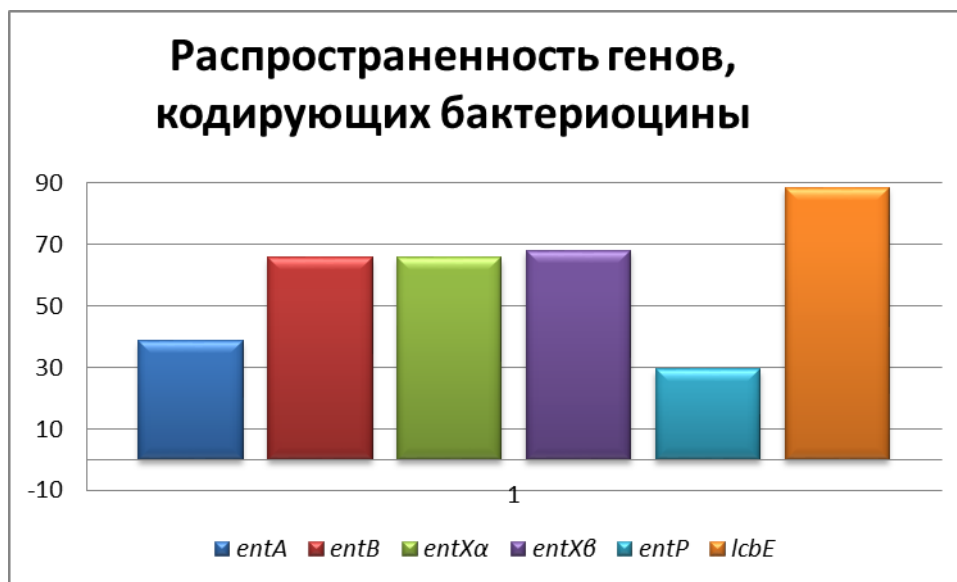


Рис. 10. Распространенность генов, кодирующих бактериоцины *E. faecium*

Было установлено, что ген *entA* присутствует у 17 (38,6%) штаммов, ген *entB* и *entX $\alpha$*  у 29 (65,9%) штаммов, *entX $\beta$*  у 30 (68,2%) штаммов, а *entP* был найден у 13 (29,5%) штаммов. 13 (30%) штаммов содержали гены *entA*, *entB*, *entX $\alpha$*  и *entX $\beta$*  вместе (рис. №10).

88,6 % штаммов содержат в своем геноме также ген *lcbE*. Согласно полногеномному секвенсу *Enterococcus faecium* L-3 ген *lcbE* располагается внутри оперона, отвечающего за синтез энтерацина А, однако распространенность гена *entA* почти в два раза меньше, чем гена *lcbE*. Можно сделать предположение, что оперон *entA* имеет различную структуру у разных штаммов *Enterococcus faecium*, и, что ген *lcbE* располагается не всегда внутри данного оперона.

ПЦР с тремя парами праймеров для амплификации участков ДНК вокруг гена *lcbE* показали различие данной области у разных штаммов *Enterococcus faecium*.

Отсюда можно сделать вывод о вариабельности участка генома, содержащего ген *lcbE*.

### 3. 3. Антимикробная активность штаммов *Enterococcus faecium*

Исследование антимикробной активности коллекционных штаммов *Enterococcus faecium* показало, что 36 штаммов (82%) подавляли рост как минимум одного штамма индикатора. Один из вариантов опыта по определению антибактериальной активности коллекционных штаммов энтерококков представлен на рисунке 11.

Наиболее чувствительным штаммом оказался клинический изолят *E. faecalis* 27, против которого были активны 33 штамма (75%). 27 штаммов (61,1%) *Enterococcus faecium* были активны против *L. ivanovii*, 23 штамма (52%) против *L. monocytogenes*. 16 штаммов (33%) были активны против *Streptococcus pyogenes*. Против *Lactobacillus sakei* и *Lactobacillus delbrueckii* 5

(11,4%) штаммов и 4 (9,1%) штамма соответственно. Ни один из штаммов не угнетает рост *S. aureus* и *E. coli*.

На рисунке 11 можно увидеть зоны угнетения роста индикаторного штамма вокруг лунок со следующими штаммами: 3,5,7.

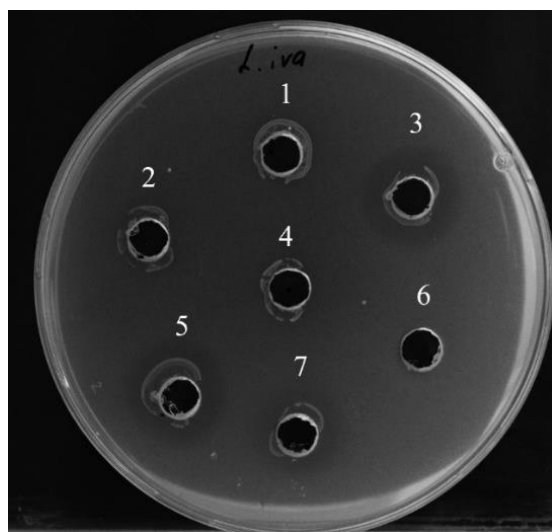


Рис. 11. Определение антимикробной активности штаммов против индикатора *Listeria ivanovii*

Полученные данные представлены в виде диаграммы (рисунок 12), показывающей долю штаммов (в процентах), проявляющих антибактериальную активность в отношении индикаторных культур.

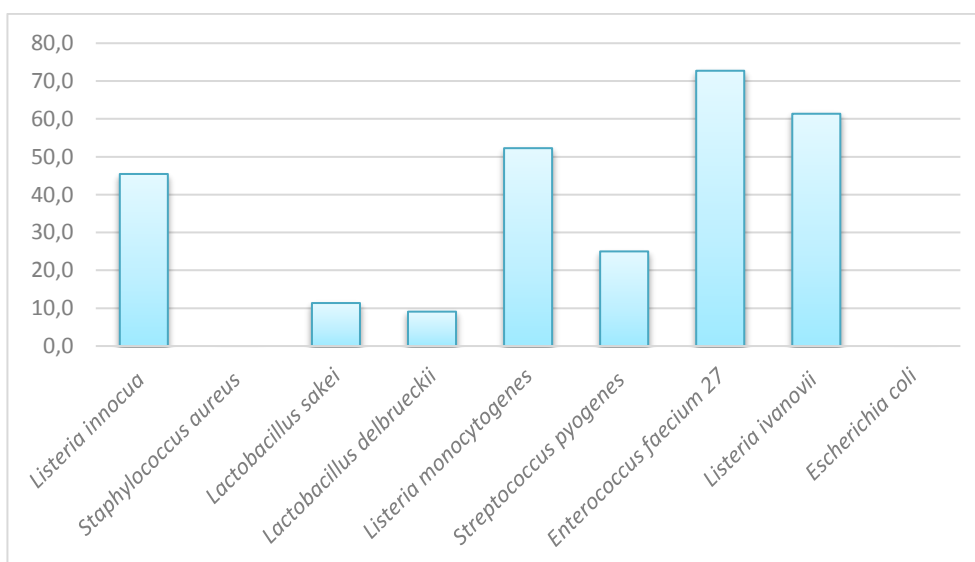


Рис. 12. Антибактериальная активность коллекционных штаммов *Enterococcus faecium*

### 3. 4. Взаимосвязь наличия *lcbE* и антимикробной активности

Корреляцию установить не удалось, так как ген *lcbE* встречается у 88,6% штаммов *Enterococcus faecium*, среди них есть штаммы с широким спектром антимикробной

активности, есть штаммы, почти не имеющие антимикробную активность. Тем более данный ген встречается почти всегда вместе с другими генами, кодирующими бактериоцины, и установить вклад конкретного гена является затруднительным.

### 3. 5. Природа антимикробной активности

Для определения природы антимикробной активности было отобрано 15 наиболее активных штаммов.

Таблица 5. Определение природы антимикробной активности штаммов

Штамм	Тип обработки	Индикаторная культура							
		<i>Listeria ivanovi</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus agalactia</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Enterococcus faecium 27</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
1	Без обработки	0	0	10	0	0	0	8	0
	Кипячение	0	0	8	0	0	0	6	0
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Без обработки	10	8	10	0	8	10	10	0
	Кипячение	8	8	8	0	0	10	6	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
4	Без обработки	10	8	10	0	8	10	10	0
	Кипячение	8	8	10	0	0	10	8	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
5	Без обработки	10	8	10	0	8	8	10	0
	Кипячение	0	0	10	0	0	8	8	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
11	Без обработки	8	8	10	0	8	10	10	0
	Кипячение	0	8	10	0	0	10	8	0
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0
21	Без обработки	10	8	10	0	8	8	10	0
	Кипячение	0	8	10	0	8	8	10	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
22	Без обработки	10	8	5	0	8	8	10	0
	Кипячение	7	8	10	0	8	8	10	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
23	Без обработки	8	8	10	0	8	8	10	0
	Кипячение	7	8	10	0	8	8	10	0
	$\alpha$ -химотрипсин	8	0	0	0	0	0	0	0
29	Без обработки	8	8	10	0	8	10	10	0

	Кипячение	8	10	10	0	8	10	10	0
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Без обработки	8	8	10	0	8	8	10	0
	Кипячение	0	8	10	0	8	8	10	0
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Без обработки	10	0	10	0	10	8	10	0
	Кипячение	8	8	10	0	8	8	8	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
39	Без обработки	10	10	10	0	10	8	8	0
	Кипячение	8	8	10	0	8	8	8	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
41	Без обработки	0	0	5	0	8	0	0	0
	Кипячение	0	0	0	0	0	0	0	0
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0
43	Без обработки	10	0	10	0	10	0	0	0
	Кипячение	0	0	5	0	0	0	0	0
	$\alpha$ -химотрипсин	10	0	0	0	0	0	0	0
L-3	Без обработки	10	8	10	8	10	10	8	8
	Кипячение	8	8	10	8	10	8	8	8
	$\alpha$ -химотрипсин	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 5 отражает изменение антимикробной активности культуральной жидкости части штаммов *Enterococcus faecium* после их обработки кипячением и  $\alpha$  - химотрипсином в сравнении с антимикробной активностью культуральной жидкости без обработки. В таблицы 5 указан диаметр зон угнетения роста индикаторных культур в мм.

### 3. 6. Взаимосвязь антимикробной активности и наличия бактериоцинов

В таблицы 6 представлена распространённость генов, кодирующих бактериоцины *Enterococcus faecium* у 15 наиболее активных штаммов

Таблица 6. Наличие генов, кодирующих бактериоцины у штаммов *Enterococcus faecium*, угнетающих рост индикаторных культур

Бактериоцин \ Штамм	Штамм														
	1	3	4	5	11	21	22	23	29	31	34	39	41	43	L3
<i>entA</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>entB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>entX<math>\alpha</math></i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>entX<math>\beta</math></i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>entP</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-



После кипячения полностью пропадает антимикробная активность только у штамма *Enterococcus faecium* 41, у других она сохраняется. У штаммов, сохранивших антимикробную активность, есть гены *entB*, *entX* и *entP*, которые кодируют термостабильные бактериоцины. У штамма 41 есть гены *entA* и *entP*, но несмотря на термостабильность бактериоцина *EntP*, вероятно, экспрессия его не происходит, и антимикробная активность данного штамма не связана с этим геном.

Антимикробная активность культуральных жидкостей штаммов *Enterococcus faecium* после обработки протеиназами полностью исчезала в отношении большинства индикаторов, за исключением *L. ivanovii*. Что связано с особой чувствительностью этого индикатора, то есть даже малое количество бактериоцинов способно подавить рост данного штамма.

Так же было установлено, что рН супернатанта существенно не отличается от рН среды, на которой выращивался *Enterococcus faecium*, и имело значение 6,5, следовательно, антимикробная активность не может быть объяснена продуцированием данными штаммами каких-либо кислот.

По данным ПЦР и оценки антимикробной активности штаммов *Enterococcus faecium* наличие генов *entX* и *entB* определяет продукцию термостабильных бактериоцинов, так как после кипячения культуральных жидкостей штаммов, имеющих данные гены, антимикробная активность не пропадает. Ген *entP* кодирует термостабильный пептид, однако культуральная жидкость штамма *Enterococcus faecium* 41, у которого из термостабильных бактериоцинов присутствовал только ген *entP*, потеряла антимикробную активность после кипячения.

Учитывая то, что в коллекции почти нет штаммов, имеющих только один бактериоцин, сложно связать определенный тип антимикробной активности с определенным бактериоцином. Однако штамм *Enterococcus faecium* 41 имеет гены, кодирующие только два бактериоцина: *entA* и *entP*, при этом если учесть то, что пропадает антимикробная активность его культуральной жидкости после кипячения, можно сделать вывод, что пептид EntA обладает антимикробной активностью против *L. monocytogenes* и *L. innocua*, а пептид EntP не продуцируется.

### 3. 7. Создание рекомбинантной конструкции

Для исследования функций гена *lcbE*, потенциально кодирующего бактериоцин, было решено создать рекомбинантную плазмиду, содержащую амплифицируемый участок ДНК, включающий ген *lcbE* для последующего инсерционного мутагенеза путем встраивания плазмиды в гомологичный амплификату участок ДНК с целью нарушения структуры гена *lcbE* и, следовательно, его инактивации.

Для успешного мутагенеза необходимо, чтобы размер области гомологии между рекомбинантной плазмидой и участком ДНК, содержащим ген *lcbE*, был достаточного размера, иначе процесс рекомбинации будет маловероятен. Однако размер самого гена *lcbE* составляет всего 216 п. н., поэтому было принято решение использовать для создания рекомбинантной конструкции амплификаты, включающие не только исследуемый ген, но и выходящие за его пределы участки ДНК.

Первая генетическая конструкция на основе вектора p7ERM(B) включала *lcbE396* (и была обозначена как *plcbE396*), вторая — *lcbE904* (*plcbE904*).

Эти два типа рекомбинантных плазмид *plcbE394* и *plcbE904* использовались для трансформации *E. coli*.

После трансформации *E. coli JM109* рекомбинантными плазмидами на чашках Петри, содержащих антибиотик эритромицин в концентрации 700 мкг/мл, выросли клоны. Было отобрано по 3 клона *E. coli*, содержащих плазмиды каждого типа. Из данных клонов выделяли ДНК и методом ПЦР (с использованием праймеров *lcbE1* и *lcbE2*) оценивали наличие вставки амплификата в рекомбинантный вектор. Результаты представлены на рисунке 13.

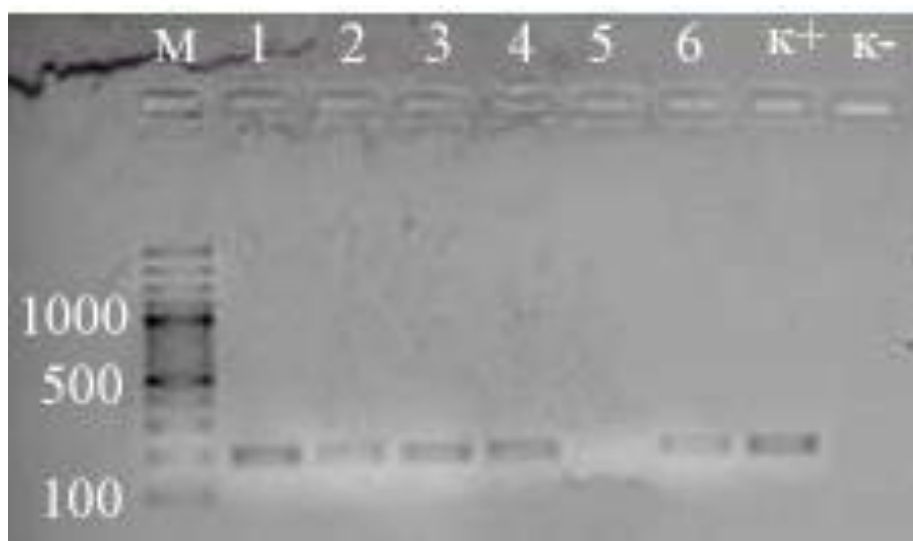


Рис. 13. Электрофореграмма продуктов ПЦР при использовании праймеров *lcbE1* и *lcbE2*. 1-3 – вставка размером 394 п. н., 4-6 – вставка размером 904 п. н. К+ -положительный контроль (штамм *E. faecium* L-3), К- -отрицательный контроль, ожидаемый размер участка ДНК – 196 н.п. М - маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Ампликоны, размером 196 п. н., были получены для всех трех клонов, содержащих *plcbE396* (дорожка 1-3, рис.13); из трех клонов трансформантов, содержащих *plcbE904*, фрагмент ДНК, длиной 196 п.н. был обнаружен у двух (дорожка 4 и 6, рис.13).

Из штамма 1 и 2 *E. coli* выделили плазмиду p<sub>lcbE396</sub>, из штамма 4 и 6 – p<sub>lcbE904</sub>. Обработка векторов ферментами рестрикции (*EcoRI* и *HindIII*) и последующий электрофорез продуктов рестрикции подтвердили включение вставок в полученные генетические конструкции. Результаты анализа представлены на рисунке 14.

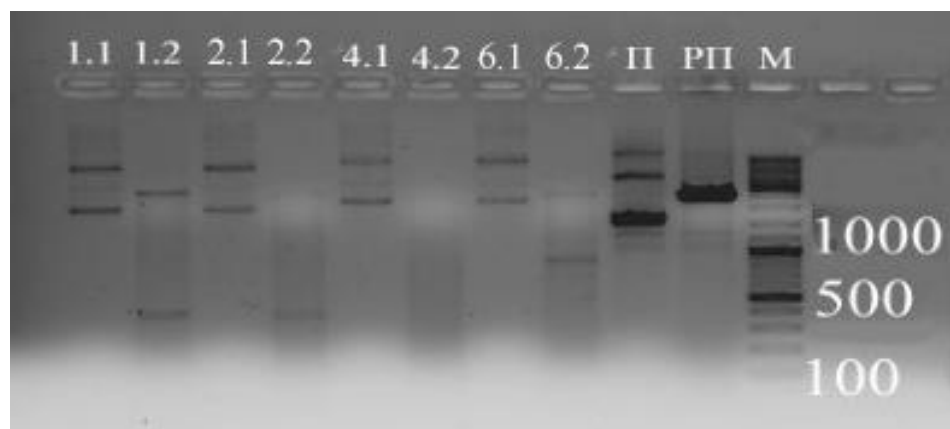


Рис. 14. Электрофореграмма продуктов рестрикции. 1.1 и 2.1 – p<sub>lcbE394</sub>, 1.2 и 2.2 – *EcoRI* и *HindIII* рестрикты p<sub>lcbE396</sub>, 4.1 и 6.1 – p<sub>lcbE904</sub>, 4.2 и 6.2 – *EcoRI* и *HindIII* рестрикты p<sub>lcbE396</sub>, П - не рестрицированная исходная плазмида, РП – рестрицированная исходная плазмида. М - маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder

На рисунке 14 видно, что рекомбинантные плазмиды двух типов были созданы успешно, так как после обработки плазмид, выделенных из штаммов *E. coli* 1,2 и 4,6 ферментами рестрикции (*EcoRI* и *HindIII*), были видны фрагменты ДНК размером, примерно, 394 п. н. и 904 п. н. соответственно, что свидетельствует о наличии данных вставок в соответствующих типах плазмид. Рекомбинантные конструкции получены успешно.

В последующем планируется использовать рекомбинантные конструкции для проведения инсерционного мутагенеза с целью инактивации гена *lcbE* у штамма *Enterococcus faecium*. В качестве такого штамма может быть предложен штамм из исследованной коллекции *E. faecium* 41, имеющий в своем геноме необходимый участок ДНК и способный проявлять антагонистическую активность по отношению к индикаторным бактериям, таким как *Listeria monocytogenes* и *L. innocua*.

## Выводы

1. Подавляюще большинство исследованных клинических штаммов *Enterococcus faecium* содержат ген *lcbE* и гены бактериоцинов.
2. Структура и состав участка ДНК, включающего ген *lcbE*, отличаются у разных штаммов. Гены *lcbE* и *entA* не обязательно локализованы в пределах одного оперона.
3. Клинические штаммы *Enterococcus faecium* проявляют ингибирующую активность в отношении грамположительных индикаторных микроорганизмов. В ряде случаев антимикробная активность обусловлена продукцией термостабильных бактериоцинов.

## Список литературы

1. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В. М. Бондаренко, А. Н. Суворов – 2007.
2. Грачева Н.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. / Н. М. Грачева, В. М. Бондаренко – 2004.
3. Симаненков В.И. Способ получения персонифицированного аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого продукта / В. И. Симаненков, А. Н. Суворов, О. И. Соловьева, Е. И. Ермоленко, А. Н. Цапиева, З. Р. Сундукова – 2015. – 2с.
4. Arias C.A. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance / C. A. Arias, B. E. Murray // *Nat. Publ. Gr.* – 2012. – Т. 10.
5. Arthur M. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. / M. Arthur, R. Quintiliani // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Т. 45 – № 2– 375–81с.
6. Aymerich T. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. / T. Aymerich, H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga, I. F. Nes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – Т. 62 – № 5– 1676–82с.
7. Berghe G. Van den Intensive Insulin Therapy in Mixed Medical/Surgical Intensive Care Units: Benefit Versus Harm / G. Van den Berghe, A. Wilmer, I. Milants, P. J. Wouters, B. Bouckaert, F. Bruyninckx, R. Bouillon, M. Schetz // *Diabetes* – 2006. – Т. 55 – № 11– 3151–3159с.
8. Bowler P.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. / P. G. Bowler, B. I. Duerden, D. G. Armstrong // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – Т. 14 – № 2– 244–69с.
9. Campos P. The epidemiology of overweight and obesity: public health crisis or moral panic? / P. Campos, A. Saguy, P. Ernsberger, E. Oliver, G. Gaesser // *Int. J. Epidemiol.* – 2005. – Т. 35 – № 1– 55–60с.
10. Carlet J. Antibacterial agents: back to the future? Can we live with only colistin, co-trimoxazole and fosfomycin? / J. Carlet, J.-L. Mainardi // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Т. 18 – № 1– 1–3с.
11. Casaus P. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A / P. Casaus, T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernandez, H. Holo // *Microbiology* – 1997. – Т. 143 – № 7– 2287–2294с.
12. Cetinkaya Y. Vancomycin-resistant enterococci. / Y. Cetinkaya, P. Falk, C. G. Mayhall // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2000. – Т. 13 – № 4– 686–707с.
13. Choi H.J. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck

- intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection / H. J. Choi, M. S. Shin, S. M. Lee, W. K. Lee // *Microbiol. Immunol.* – 2012. – T. 56 – № 9– 613–620c.
14. Cintas L.M. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. / L. M. Cintas, P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández, I. F. Nes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – T. 63 – № 11– 4321–30c.
15. Cintas L.M. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. / L. M. Cintas, P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernandez, I. F. Nes, L. S. Håvarstein // *J. Bacteriol.* – 1998. – T. 180 – № 8– 1988–94c.
16. Cleveland J. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. / J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes, M. L. Chikindas // *Int. J. Food Microbiol.* – 2001. – T. 71 – № 1– 1–20c.
17. Cotter P.D. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? / P. D. Cotter, R. P. Ross, C. Hill // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – T. 11 – № 2– 95–105c.
18. Deegan L.H. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension / L. H. Deegan, P. D. Cotter, C. Hill, P. Ross // *Int. Dairy J.* – 2006. – T. 16 – № 9– 1058–1071c.
19. Drider D. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins / D. Drider, G. Fimland, Y. Hechard, L. M. McMullen, H. Prevost // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2006. – T. 70 – № 2– 564–582c.
20. Durham-Pierre D. African origin of an intragenic deletion of the human P gene in tyrosinase positive oculocutaneous albinism / D. Durham-Pierre, J. M. Gardner, Y. Nakatsu, R. A. King, U. Francke, A. Ching, R. Aquaron, V. del Marmol, M. H. Brilliant // *Nat. Genet.* – 1994. – T. 7 – № 2– 176–179c.
21. Dutka-Malen S. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. / S. Dutka-Malen, S. Evers, P. Courvalin // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – T. 33 – № 1– 24–7c.
22. Eaton T.J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates / T. J. Eaton, M. J. Gasson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – T. 67 – № 4– 1628–1635c.
23. Endtz H.P. Vancomycin Resistance: Status Quo and Quo Vadis / H. P. Endtz, N. Van Den Braak, H. A. Verbrugh, A. Van Belkum // *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* – 1999. – T. 18– 683–690c.
24. Fernández-Guerrero M.L. Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. / M. L. Fernández-Guerrero, L. Herrero, M. Bellver, I. Gadea, R. F. Roblas, M. de Górgolas // *J. Intern. Med.* – 2002. – T. 252 – № 6– 510–5c.
25. Fisher K. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* / K. Fisher, C. Phillips // *Microbiology* – 2009. – T. 155 – № 6– 1749–1757c.

26. Foulquié Moreno M.R. The role and application of enterococci in food and health / M. R. Foulquié Moreno, P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou, L. De Vuyst // *Int. J. Food Microbiol.* – 2006. – T. 106 – № 1– 1–24c.
27. Franz C.M.A.P. Enterococci as probiotics and their implications in food safety / C. M. A. P. Franz, M. Huch, H. Abriouel, W. Holzappel, A. Gálvez // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – T. 151– 125–140c.
28. Franz C.M. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. / C. M. Franz, A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, W. H. Holzappel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – T. 67 – № 9– 4385–9c.
29. Franz C.M. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. / C. M. Franz, A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, W. H. Holzappel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – T. 67 – № 9– 4385–9c.
30. Gaggia F. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production / F. Gaggia, P. Mattarelli, B. Biavati // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – T. 141– S15–S28c.
31. Garneau S. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. / S. Garneau, N. I. Martin, J. C. Vederas // *Biochimie* – T. 84 – № 5–6– 577–92c.
32. Gill S.S. Direct brain infusion of glial cell line–derived neurotrophic factor in Parkinson disease / S. S. Gill, N. K. Patel, G. R. Hotton, K. O’Sullivan, R. McCarter, M. Bunnage, D. J. Brooks, C. N. Svendsen, P. Heywood // *Nat. Med.* – 2003. – T. 9 – № 5– 589–595c.
33. Giraffa G. Enterococci from foods. / G. Giraffa // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2002. – T. 26 – № 2– 163–71c.
34. Heel A.J. van Evaluating the feasibility of lantibiotics as an alternative therapy against bacterial infections in humans / A. J. van Heel, M. Montalban-Lopez, O. P. Kuipers // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* – 2011. – T. 7 – № 6– 675–680c.
35. Hegstad K. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* / K. Hegstad, T. Mikalsen, T. M. Coque, G. Werner, A. Sundsfjord // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – T. 16 – № 6– 541–554c.
36. Hlivak P. Long-term (56-week) oral administration of probiotic *Enterococcus faecium* M-74 decreases the expression of sICAM-1 and monocyte CD54, and increases that of lymphocyte CD49d in humans. / P. Hlivak, E. Jahnova, J. Odraska, M. Ferencik, L. Ebringer, Z. Mikes // *Bratisl. lek. List.* – 2005. – T. 106 – № 4–5– 175–181c.
37. Hu C.-B. Enterocin X, a Novel Two-Peptide Bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, Has an Antibacterial Spectrum Entirely Different from Those of Its Component Peptides / C.-B. Hu, W. Malaphan, T. Zendo, J. Nakayama, K. Sonomoto // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – T. 76 – № 13– 4542–4545c.

38. Huebner W.F. From Coma Abundances to Nucleus Composition / W. F. Huebner, J. Benkhoff // *Space Sci. Rev.* – 1999. – T. 90– № 1/2– 117–130c.
39. Hufnagel M. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. / M. Hufnagel, L. E. Hancock, S. Koch, C. Theilacker, M. S. Gilmore, J. Huebner // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – T. 42 – № 6– 2548–57c.
40. Karaseva A. Draft Genome Sequence of Probiotic *Enterococcus faecium* Strain L-3. / A. Karaseva, A. Tsapieva, J. Pachebat, A. Suvorov // *Genome Announc.* – 2016. – T. 4 – № 1.
41. Kemperman R. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. / R. Kemperman, A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers, J. Kok // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – T. 69 – № 3– 1589–97c.
42. Klaenhammer T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. / T. R. Klaenhammer // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1993. – T. 12 – № 1–3– 39–85c.
43. Klare I. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. / I. Klare, C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner, W. Witte // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – T. 88 – № 2–3– 269–90c.
44. Kwaadsteniet M. De Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria / M. De Kwaadsteniet, S. D. Todorov, H. Knoetze, L. M. T. Dicks // *Int. J. Food Microbiol.* – 2005. – T. 105 – № 3– 433–444c.
45. Landman D. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. / D. Landman, J. M. Quale // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1997. – T. 40 – № 2– 161–70c.
46. Leavis H.L. High-Level Ciprofloxacin Resistance from Point Mutations in *gyrA* and *parC* Confined to Global Hospital-Adapted Clonal Lineage CC17 of *Enterococcus faecium* / H. L. Leavis, R. J. L. Willems, J. Top, M. J. M. Bonten // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – T. 44 – № 3– 1059–1064c.
47. Li K. Multitarget Drug Discovery for Tuberculosis and Other Infectious Diseases / K. Li, L. A. Schurig-Briccio, X. Feng, A. Upadhyay, V. Pujari, B. Lechartier, F. L. Fontes, H. Yang, G. Rao, W. Zhu, A. Gulati, J. H. No, G. Cintra, S. Bogue, Y.-L. Liu, K. Molohon, P. Orlean, D. A. Mitchell, L. Freitas-Junior, F. Ren, H. Sun, T. Jiang, Y. Li, R.-T. Guo, S. T. Cole, R. B. Gennis, D. C. Crick, E. Oldfield // *J. Med. Chem.* – 2014. – T. 57 – № 7– 3126–3139c.
48. Manson J.M. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits / J. M. Manson, L. E. Hancock, M. S. Gilmore // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – T. 107 – № 27– 12269–12274c.
49. Mazmanian S.K. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S. K. Mazmanian, J. L. Round, D. L. Kasper // *Nature* – 2008. – T. 453 – № 7195– 620–625c.



50. McKessar S.J. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. / S. J. McKessar, A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, J. C. Paton // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – T. 44 – № 11– 3224–8c.
51. Michael S Gilmore, Don B Clewell, Yasuyoshi Ike N.S. *Enterococci From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* / N. S. Michael S Gilmore, Don B Clewell, Yasuyoshi Ike – 2014.
52. Mundy P. EEG correlates of the development of infant joint attention skills. / P. Mundy, J. Card, N. Fox // *Dev. Psychobiol.* – 2000. – T. 36 – № 4– 325–38c.
53. Neysens P. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions / P. Neysens, W. Messens, D. Gevers, J. Swings, L. De Vuyst // *Microbiology* – 2003. – T. 149 – № 4– 1073–1082c.
54. O’Keeffe T. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin a production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. / T. O’Keeffe, C. Hill, R. P. Ross // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – T. 65 – № 4– 1506–15c.
55. Ojala V. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance / V. Ojala, J. Laitalainen, M. Jalasvuori // *Evol. Appl.* – 2013. – T. 6 – № 6– 925–932c.
56. Perez R.H. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications / R. H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto // *Microb. Cell Fact.* – 2014. – T. 13– S3c.
57. Refardt D. Combining forces to target bacteria. / D. Refardt // *Evol. Appl.* – 2012. – T. 5 – № 6– 537–9c.
58. Riboldi G.P. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein. / G. P. Riboldi, H. Verli, J. Frazzon // *BMC Biochem.* – 2009. – T. 10– 3c.
59. Riley M.A. (Margaret A..*Bacteriocins : ecology and evolution* / M. A. (Margaret A. . Riley, M. A. (Milind A. . Chavan – Springer, 2007.– 150c.
60. Riley M.A. *Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application* / M. A. Riley, J. E. Wertz // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – T. 56 – № 1– 117–137c.
61. Salminen S. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. / S. Salminen, E. Isolauri, E. Salminen // *Antonie Van Leeuwenhoek* – 1996. – T. 70 – № 2–4– 347–58c.
62. Salzman N.H. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin / N. H. Salzman, D. Ghosh, K. M. Huttner, Y. Paterson, C. L. Bevins // *Nature* – 2003. – T. 422 – № 6931– 522–526c.
63. Shankar P. Viral-specific cytotoxic T lymphocytes lyse human immunodeficiency virus-infected primary T lymphocytes by the granule exocytosis pathway. / P. Shankar, Z. Xu, J. Lieberman //

Blood – 1999. – T. 94 – № 9– 3084–93c.

64. Singh B. Protective and destructive effects of microbial infection in insulin-dependent diabetes mellitus / B. Singh, S. Prange, A. M. Jevnikar // *Semin. Immunol.* – 1998. – T. 10 – № 1– 79–86c.

65. Su X.Z. Cloning and characterization of gene TNF alpha encoding equine tumor necrosis factor alpha. / X. Z. Su, D. D. Morris, R. A. McGraw // *Gene* – 1991. – T. 107 – № 2– 319–21c.

66. Tarasova E. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics / E. Tarasova, E. Yermolenko, V. Donets, Z. Sundukova, A. Bochkareva, I. Borschev, M. Suvorova, I. Ilyasov, V. Simanenkov, A. Suvorov // *Benef. Microbes* – 2010. – T. 1 – № 3– 265–270c.

67. Timmerman H.M. Health and Growth of Veal Calves Fed Milk Replacers With or Without Probiotics / H. M. Timmerman, L. Mulder, H. Everts, D. C. van Espen, E. van der Wal, G. Klaassen, S. M. G. Rouwers, R. Hartemink, F. M. Rombouts, A. C. Beynen // *J. Dairy Sci.* – 2005. – T. 88 – № 6– 2154–2165c.

68. Timmerman R. An Eight-year Follow-up to a Randomized Clinical Trial of Participant Satisfaction with Three Types of Mandibular Implant-retained Overdentures / R. Timmerman, G. T. Stoker, D. Wismeijer, P. Oosterveld, J. I. J. F. Vermeeren, M. A. J. van Waas // *J. Dent. Res.* – 2004. – T. 83 – № 8– 630–633c.

69. Vancanneyt M. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. / M. Vancanneyt, A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Björkroth, C. M. A. P. Franz, M. R. Foulquié Moreno, H. Revets, L. De Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio, W. H. Holzapfel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – T. 68 – № 3– 1381–91c.

70. Vuyst L. De Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications / L. De Vuyst, F. Leroy // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – T. 13 – № 4– 194–199c.

71. Wunderlich P.F. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea / P. F. Wunderlich, L. Braun, I. Fumagalli, V. D'Apuzzo, F. Heim, M. Karly, R. Lodi, G. Politta, F. Vonbank, L. Zeltner // *J. Int. Med. Res.* – 1989. – T. 17 – № 4– 333–338c.