

УЧРЕДИТЕЛИ:
ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ВСЕРОССИЙСКОЕ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ЭПИДЕМИОЛОГОВ, МИКРОБИОЛОГОВ И ПАРАЗИТОЛОГОВ

ЖУРНАЛ МИКРОБИОЛОГИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ИММУНОБИОЛОГИИ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. В. ЗВЕРЕВ, д.б.н., проф., академик РАН

В.Г.АКИМКИН, д.м.н., проф., академик РАН; Ю.В.АНАНЬИНА, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Н.И.БРИКО, д.м.н., проф., академик РАН; О.В.БУХАРИН, д.м.н., проф., академик РАН; А.Л.ГИНЦБУРГ, д.м.н., проф., академик РАН; А.В.КАРАУЛОВ, д.м.н., проф., академик РАН; М.П.КОСТИНОВ, д.м.н., проф.; В.В.КУТЫРЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; В.В.МАЛЕЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; М.И.МИХАЙЛОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Г.Г.ОНИЩЕНКО, д.м.н., проф., академик РАН; А.Е. ПЛАТОНОВ, д.б.н., проф.; В.И.ПОКРОВСКИЙ, д.м.н., проф., академик РАН; Р.И.СЕПИАШВИЛИ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; В.П.СЕРГИЕВ, д.м.н., проф., академик РАН; Арег АТОТОЛЯН, д.м.н., проф., академик РАН; Н.Н.ФИЛАТОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; С.В.ЧЕРКАСОВ, д.м.н., проф., член-корр. РАН; Н.Д.ЮЩУК, д.м.н., проф., академик РАН

Двухмесячный научно-практический журнал

Основан в 1924 г.

4

июль—август

МОСКВА 2018

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

БРУСИНА Е.Б. (Кемерово), ЗУЕВА Л.П. (Санкт-Петербург), КОРОЛЮК А.М. (Санкт-Петербург), МАМЕДОВ М.К. (Баку), ПРИСАКАРЬ В.И. (Кишинев), ТИТОВ Л.П. (Минск), ШАРКОВА В. (Владивосток), ШЕНДЕРОВ Б.А. (Москва), ШКАРИН В.В. (Н. Новгород)

Адрес редакции:

105064, Москва, М. Казенный пер., 5А, НИИВС им. И.И.Мечникова.

Статьи посылать: mech.inst@mail.ru

Зав. редакцией Л.В.Иваничева

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.
Свидетельство ПИ № ФС77-36745

Каталоги по доподписке на II полугодие 2018 г.:
Каталог Агентство «Роспечать»: индекс 71 436;
объединенный каталог «Пресса России»: индекс 10 277.

**Журнал индексируется в Scopus, РИНЦ,
входит в перечень ВАК, является органом ВНОЭМП**

Формат 70x108 1/16. Печать офсетная.

Отпечатано в ООО «Буки Веди»
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11
Тел.: (495) 926-63-96
www.bukivedi.com
E-mail: info@bukivedi.com

ПРЕДИСЛОВИЕ

Очередная (22-24 сентября 2018 г.) 9 научная инфектологическая конференция, традиционно рассматривающая вопросы персистенции микроорганизмов и их симбиотические отношения при инфекции, проводится в Оренбурге совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ.

В связи с проведенной реструктуризацией науки в России сменил вывеску и Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, ставший структурным подразделением Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук. Не меняются лишь люди, сохраняющие увлеченность и интерес к изучаемой проблеме.

Представленные доклады с известной долей условности можно разделить на 3 секции: 1. Симбиотические взаимодействия нормофлоры и хозяина. 2. Инфектологические механизмы симбиотических взаимодействий; 3. Медико-биологические аспекты природных симбиозов.

В центре внимания исследователей оказались вопросы инфекционной симбиологии — от фундаментальных исследований до прикладных разработок. Ряд новых исследований осуществлен при расшифровке биологической роли основных наших помощников в регуляции гомеостаза организма (бифидо- и лактофлора).

Выявлен пул исследований, направленных на изучение иммунорегляторных механизмов, участвующих в поддержании гомеостаза (здоровья) человека. Эти работы всегда будут востребованы и для создания новых био-препаратов. Не остался без внимания и медико-биологический блок работ, где биологи выявляют новые возможности симбиотической концепции, расширяя сферу применения полученных знаний.

В целом заявленные материалы, с которыми может познакомиться читатель журнала, отвечая духу времени, дают ответы на возникающие вопросы. Пожалуй, это самое главное и уж как тут не согласиться с Нобелевским лауреатом Нильсом Бором, который считал: «Вопросы ценнее ответов. Ответы могут устареть, а вопросы остаются». Поиск ответов на поставленные вопросы — это и есть прямой путь к созданию новых «здоровьесберегающих технологий», которые будут использованы в ближайшее время в целях сохранения здоровья российского человека.

Сопредседатели программного комитета:

Академик РАН
Академик РАН

О.В. Бухарин
А.Л. Гинцбург

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НОРМОФЛОРЫ И ХОЗЯИНА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

С.В.Андрющенко, Е.В.Иванова, Н.Б.Перунова, О.В.Бухарин, А.В.Бекпергенова

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АДАПТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА БИФИДОБАКТЕРИЙ БИОТОПА ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Определение отличительных параметров геномов *B. bifidum* и *B. longum*, характеризующих их адаптивный потенциал применительно к биотопу дистального отдела толстого кишечника человека. *Материалы и методы.* В работе использованы 5 штаммов бифидобактерий: *B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-643, *B. bifidum* ICIS-791, *B. longum* ICIS-505 (клинические изоляты) и *B. longum* MC-42 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Полногеномное секвенирование проведено при помощи секвенатора «MiSeq» и набора подготовки ДНК-библиотек «Nextera» v.3 (Illumina, США). Аннотация и первичный анализ набора генов известных гомологов в полученных геномах осуществлен с помощью онлайн-сервиса RAST (коллаборация NMPDR, США). *Результаты.* У штамма *B. bifidum* ICIS-310 не обнаруживаются гомологи гена пермеазы лактозы и галактозы, присутствующие в двух других секвенированных штаммах *B. bifidum*, но сохранены два гена экзо-альфа-сиалидазы, а также выявляется дополнительный ген семейства ДНК-метилтрансфераз. Клинические изоляты *B. longum* демонстрируют несколько больше различий между собой: штамм *B. longum* ICIS-505 содержит на 200 генов больше, чем эталонный штамм *B. longum* MC-42, из которых 29 — гомологи с установленной функцией. Данные гены распределены равномерно по функциональным классам. *Заключение.* Полученные данные анализа генома бифидобактерий отражают их специализацию в занимаемом биотопе и мутуалистическую надежность, определяя доминантную роль бифидофлоры в кишечном микросимбиозе человека. Размер генома, постоянство сигнального ценза и предсказуемость реакций бифидобактерий позволяют использовать их в качестве типовых моделей, пригодных для исследования симбиотических отношений человека и его микробиоты, а также построения экспериментальных систем межмикробных взаимодействий.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 4—11

Ключевые слова: бифидобактерии, полногеномное секвенирование, сигнальный ценз, эволюция микросимбионтов, симбиоз

S.V.Andryuschenko, E.V.Ivanova, N.B.Perunova, O.V.Bukharin, A.V.Bekpergenova

GENETIC CHARACTERISTICS OF THE ADAPTIVE POTENTIAL OF BIFIDOBACTERIA IN THE BIOTOPE OF DISTAL HUMAN INTESTINE

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. Determination of distinctive parameters of the *B. bifidum* and *B. longum* genomes, which characterizes their adaptive potential applied to distal intestine biotope of the human gut. *Materials and methods.* 5 strains of bifidobacteria have been used: *B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-643, *B. bifidum* ICIS-791, *B. longum* ICIS-505 (clinical isolates) и *B. longum* MC-42. Whole Genome Sequencing (WGS) has been performed by «MiSeq» DNA sequencer

and «Nextera» DNA library preparation kit (Illumina). Annotation and the primary analysis of known homologues gene content has been performed by RAST service (NMPDR). *Results.* *B. bifidum* ICIS-310 has not revealed lactose and galactose permease genes, that present in two other sequenced *B. bifidum* strains, but two exo- α -sialidase genes has remained, as well as additional gene of DNA-methyltransferases family. Clinical isolates of *B. longum* has demonstrated a slightly more differences between each other: *B. longum* ICIS-505 strain contains more than 200 genes more than *B. longum* MC-42 reference strain, where are 29 genes — homologues with known function. These genes are distributed uniformly by functional groups. *Conclusion.* Obtained data of genome analysis of the bifidobacteria reflect their specialization in occupied biotope and mutualistic reliability, determining dominance role of bifidoflora in human gut microsymbiocoenosis. Genome size, stability of signal census and predictability of reactions of the bifidobacteria allow to use them as a general model suitable for studying of symbiotic relations of human and his/her microbiota as well as construction of the experimental systems of intermicrobial interactions.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 4—11

Key words: bifidobacteria, WGS, signal census, evolution of microsymbionts, symbiosis

ВВЕДЕНИЕ

Роль бактерий рода *Bifidobacterium* в функционировании пищеварительного тракта человека известна давно [14], тогда как механизмы, определяющие место бифидобактерий как фактора стабилизации микросимбиоза, включая феномен межмикробного распознавания, активно исследуются в настоящее время [1, 11].

В то же время, результаты тотальных генетических сиквенс-скринингов кишечного микробиома, расширив номенклатуру его видового состава, выявили, что численность бифидобактерий, как и других представителей *Actinobacteria*, в нем относительно невелика [3]. Но выявленный изначально количественный дисбаланс, кроме того, что во многом обусловлен несовершенством применявшихся методик пробоподготовки микробиомных скринингов [9, 12], сам по себе не может служить опровержением функциональной роли того или иного звена микробиоценоза. Поэтому расширение корпуса общедоступных физиологических, биохимических и молекулярно-генетических данных о представителях рода *Bifidobacterium*, населяющих толстый кишечник человека, по сей день имеет существенное значение для создания моделей симбиотических взаимоотношений человека и его микробиоты. Особенно с учетом того, что в центральной базе данных нуклеотидных последовательностей Национального Центра Биотехнологической Информации (США, Bethesda) количество доступных завершенных геномов целого ряда высокораспространенных видов облигатно-анаэробных бактерий, населяющих биотоп в высокой численности, таких как *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* все еще не превышает десятка записей.

Выполнить комплексный анализ получаемых геномных данных позволяет способ, разработанный для оценки регуляторного потенциала адаптации бактерии по ее геному в целом — посредством определения «сигнального ценза» как числа генов, кодирующих белки клеточных регуляторных систем, и вычисления относительного показателя — «бактериального IQ» [4, 5]. Этот показатель позволяет упростить первичный анализ получаемых при полногеномном секвенировании данных и оценить общий репертуар регуляторных эффектов исследуемых видов бактерий в симбиотических взаимодействиях,

что особенно важно при отборе как индикаторных, так и пробиотических штаммов бифидобактерий.

В связи с изложенным, целью настоящей работы стало определение отличительных параметров геномов бифидобактерий видов *B. bifidum* и *B. longum*, характеризующих их адаптивный потенциал применительно к биотопу дистального отдела толстого кишечника человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 4 клинических изолята бифидобактерий *B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-643, *B. bifidum* ICIS-791, *B. longum* ICIS-505, выделенные от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника, и эталонный штамм *B. longum* MC-42 (ГИСК им. Л.А.Тарасевича).

Культивирование исследуемых штаммов производилось во флаконах, содержащих 4 мл стерильной среды Шедлера (HiMedia, Индия). Все исследуемые штаммы инкубировали в анаэрокате Binder при содержании кислорода от 0,2 до 0,6%, углекислого газа от 5 до 9% и температуре 37°C в течение 48 часов.

По завершению инкубации культуральную среду центрифугировали в течение 6 минут при 4000 g с последующим удалением супернатанта. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мкл трис-солевого буфера с добавлением 2 мкг лизоцима куриного яичного белка, инкубировали при 37 °C в течение 1 часа, затем механически гомогенизировали сферическими гранулами диаметром 1,4 мм в течение 1 мин. со скоростью 6,5 м/с. Инактивация ДНКаз производилась прогреванием суспензии до 95°C в течение 10 минут, затем производилось добавление 50 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и 2 мкл раствора протеиназы К к каждой пробе и инкубация при 60 °C в течение 1 часа. Выделенная ДНК подвергалась трехкратной фенол-хлороформной экстракции ДНК [7], последующему осаждению и трехкратному промыванию этанолом [2], и растворению в 30 мкл деионизированной воды I типа качества («Milli-Q»). После очистки ДНК исследуемых штаммов хранилась при -20°C.

Подготовка ДНК-библиотек для секвенирования производилась с использованием набора Nextera DNA Library Preparation Kit («Illumina», США) по прилагающемуся протоколу.

Полногеномное секвенирование выделенных ДНК проведено при помощи секвенатора «MiSeq» с комплектом реагентов Reagent Kit v.3 («Illumina», США). Длина получаемых парных ридов составила до 2*300 нуклеотидов. Анализ качества чтения проводился при помощи программного обеспечения «FastQC» (Babraham Bioinformatics, Великобритания).

Предподготовка парных ридов к сборке выполнена в программе «Trimmomatic» (Usadel Lab, Германия). Сборка парных ридов до скаффолдов выполнена ассемблером «SPAdes»; статистическая оценка качества сборки проведена при помощи программного обеспечения «QUAST» (лаборатория алгоритмической биологии Санкт-Петербургского академического университета). В качестве референсных были выбраны полные геномы штаммов *B. bifidum* PRL2010 и *B. longum* NCC2705.

Аннотация и первичный анализ набора генов известных гомологов в полученных геномах осуществлен с помощью онлайн-сервиса RAST (коллаборация NMPDR, США).

Определение сигнального ценза геномов бактерий выполнено по M.Y.Galperin et al. в модификации от 2010 года [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В аннотированных сервисом RAST геномах всех секвенированных штаммов исследуемых бифидобактерий доля гомологов генов с достоверно известной функцией находится в диапазоне от 68 до 74%; доля генов, образующих функциональные подсистемы, составила 41 — 42% у всех рассмотренных штаммов, за исключением *B. longum* MC-42, у которого данный параметр равен 45,3% (840 из 1853 генов).

Секвенирование штаммов *B. bifidum* показало, что итоговые длины полученных сборок в среднем на 50 тысяч пар нуклеотидов и на 200 потенциальных рамок считывания больше, чем в четырех полных геномах NCBI, но не превышает верхнего значения размера генома для данного вида в 2,28 тысяч пар нуклеотидов.

Доля GC-пар также полностью соответствует другим секвенированным к настоящему времени штаммам данного вида и составляет 62 — 63% [8]. У секвенированных штаммов сохраняется широкий набор известных генов, обеспечивающих симбиотические взаимодействия бактерий данного вида с организмом хозяина: ферменты расщепления олигосахаридов человеческого молока и кишечного муцина [12, 13]. В то же время, у штамма *B. bifidum* ICIS-310 не обнаруживаются гомологи гена пермеазы лактозы и галактозы, присутствующие в двух других секвенированных штаммах *B. bifidum*, но сохранены два гена экзо-альфа-сиалидазы, а также выявляется дополнительный ген семейства ДНК-метилтрансфераз (табл. 1).

Эти факты свидетельствуют о высокой генетической однородности исследуемых штаммов вида *B. bifidum* и подтверждают валидность примененных в данной работе методик секвенирования и анализа полученных последовательностей.

Секвенированные штаммы *B. longum* демонстрируют несколько больше различий между собой: штамм *B. longum* ICIS-505 содержит на 200 генов больше, чем *B. longum* MC-42, из которых 29 — гомологи с установленной функцией. Данные гены распределены равномерно по функциональным классам, главным образом в классах фаговых генов, систем противовирусной защиты и стресс-регуляторных систем. Эта особенность может быть

Таблица 1. Сравнение референсного и опытных геномов *B. bifidum*

Признак (по RAST)	<i>B. bifidum</i> PRL2010	<i>B. bifidum</i> ICIS-310	<i>B. bifidum</i> ICIS-643	<i>B. bifidum</i> ICIS-791
Размер генома, нуклеотидов	2 214 656	2 219 632	2 282 155	2 266 496
Общее число кодирующих генов	1791	1845	1903	1898
Число генов, не кодирующих РНК	61	58	58	60
Уникальных известных генов	—	1	0	1
Гены резистентности	β -лактамаза	0	0	β -лактамаза
Углеводный обмен	1,3/4-фукозидаза 1,2-фукозидаза	0	пермеаза лактозы и галактозы	
Мембранный транспорт	0	0		
Неспецифический противовирусный иммунитет и метаболизм ДНК	М-субъединица ДНК-метил-трансферазы	М-субъединица ДНК-метил-трансферазы		0
Клеточная стенка и капсула	0	yjeE	0	0
Прочие кластеризованные гены	СТР-синтаза	0	СТР-синтаза	

Таблица 2. Сравнение референсного и опытных геномов *B. longum*

Признак (по RAST)	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. longum</i> MC-42	<i>B. longum</i> ICIS-505
Размер генома	2 260 272	2 280 366	2 449 474
Общее число кодирующих генов	1879	1853	2059
Число генов, не кодирующих РНК	75	63	85
Число генов сигнальных систем	10	11	12
Уникальных известных генов	44	17	29
Гены резистентности	Компоненты <i>uidC/D</i> системы транслокации	0	Регулятор <i>merF</i> системы устойчивости к тяж.мет.
Углеводный обмен	3	7	3
Мембранный транспорт	Mg^{2+} АТФаза Fe^{2+} пермеаза	0	<i>tolA</i>
Обмен аминокислот	цитозин-деаминаза		2
Неспецифический противовирусный иммунитет, метаболизм ДНК	9	1	8
Адаптивный противовирусный иммунитет (CRISPR/Cas)		хеликаза <i>cas3</i>	2
Клеточная стенка и капсула	6 генов синтеза рамнозосодержащих гликанов	2	4 гена синтеза рамнозосодержащих гликанов
Синтез изопреноидов	2	3	0
Прочие кластеризован. гены	3	гликозил-трансфераза I группы	3
Стресс-ответ	2	0	3
Профаговые гены	0	0	фаговая терминаза
Биосинтез биотина	0	белок компетентности F	0

результатом меньшего числа пассажей клинического изолята *B. longum* ICIS-505 на искусственных питательных средах, произведенных с момента его выделения до момента секвенирования по сравнению со штаммом *B. longum* MC-42, депонированным в 1976 г. ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Тем не менее, указанные различия не выходят за уровень вариабельности количества генов, определенных в полных геномах штаммов *B. longum*, депонированных в базе данных GenBank к настоящему моменту (табл. 2)

Также следует отметить, что гены, обеспечивающие оба пути синтеза ключевого предшественника «аутоиндуктора-2» — важного медиатора межвидовой коммуникации — дигидрокси-2,3-пентандиона (ДПД) как из S-рибозил-L-гомоцистеина (ген *luxS*), так и из рибулозо-5-фосфата [13] в виде генов двух ферментов, обеспечивающих взаимопревращение двух его стереоизомеров (рибулозо-фосфат 3-эпимеразы и L-рибулозо-5-фосфат 4-эпимеразы) присутствуют у всех секвенированных штаммов. В то же время, других ферментов путей превращения пентоз (KEGG) выявлено не было.

На заключительном этапе исследования было проведено вычисление абсолютного сигнального ценза исследуемых штаммов: суммарное число известных генов регуляторных систем составило 28 во всех трех исследованных геномах бактерий *B. longum*, тогда как у *B. bifidum* выявлены небольшие различия в общем числе данной группы генов: 29 у штамма *B. bifidum* ICIS-310, 35 у штамма *B. bifidum* ICIS-643 и 34 у штамма *B. bifidum* ICIS-791. Значения

относительного показателя сигнального ценза — «бактериального IQ» у *B. longum* находятся в диапазоне 112 — 121 единиц, у исследованных штаммов *B. bifidum* варьируют в пределах от 125 до 133 единиц.

ОБСУЖДЕНИЕ

Накопленный к настоящему времени массив молекулярно-генетических данных в отношении рода *Bifidobacterium* и семейства *Bifidobacteriaceae* позволяет на основе полученных данных оценить эволюционную роль целого ряда как качественных, так и количественных характеристик геномов бифидобактерий в адаптации этих микроорганизмов к биотопам их макропартнеров. Известно, что такие наиболее общие количественные параметры генома, как его полная длина и доля уникальной кодирующей части, отражают экологическую историю бактерий, поскольку основным трендом долговременной эволюции свободноживущих форм прокариот является редукция части генома, не находящейся под давлением отбора [15], что приводит к определенной фиксации физиологических возможностей микроорганизмов. Показано, что в сравнении с другими мутаалистическими микросимбионтами млекопитающих, в частности, лактобациллами — у бифидобактерий произошло относительно немного генных потерь [10]. Итоговый размер их генома несколько больше такового у видов лактобацилл, стабильно населяющих женский репродуктивный тракт, за исключением *Lactobacillus crispatus*, также имеющего геном длиной в 2,2 миллиона нуклеотидных пар. Поэтому, в сравнении с лактобациллами, кишечные представители рода бифидобактерий сохраняют большую широту возможных адаптивных реакций. Несмотря на то, что ни один из известных представителей этих групп до сего дня не стал облигатным симбионтом млекопитающих, это расхождение может иметь следующее объяснение: в отличие от обитающих в репродуктивном тракте лактобацилл, биотопы, занимаемые бифидобактериями, имеют существенно большее биохимическое разнообразие и широкое микросимбиотическое окружение, что требует большего набора соответствующих адаптаций. Это соображение подтверждается наличием у бифидобактерий широкого арсенала ферментов углеводного обмена, определяющего их биохимическую нишу в кишечнике [1]. С другой стороны, все представители порядка *Bifidobacteriales* являются облигатными анаэробами и поэтому имеют существенно меньшую вероятность к заселению биотопов во внешней среде, следовательно, адаптация к симбиотическому существованию у этой группы могла начаться задолго до ответвления рода *Bifidobacterium*. Действительно, среди семейства *Bifidobacteriaceae* широко представлены симбионты пищеварительного тракта как млекопитающих, так и насекомых (род *Aeriscardovia*, род *Bombiscardovia*). При этом, отмечается, что данная группа бактерий наиболее характерна для животных, практикующих тесные социальные взаимодействия и характеризующихся сильной зависимостью потомства от родительской заботы [14], что служит дополнительным аргументом их высокой специализации к почти строгому симбиотическому существованию *in vivo*.

Со стороны хозяина мутуалистическая надежность бифидобактерий, принадлежащих к типу *Actinobacteria*, в эволюционной перспективе подкрепляется их филогенетической удаленностью от большинства патогенных и условно патогенных бактерий, способных проникнуть и закрепиться в дистальных отделах пищеварительного тракта, что обеспечивает усиленную изоляцию бифидобактерий от приобретения ими «островов патогенности» путем горизонтального переноса генов. Это общее соображение также под-

тверждается геномными исследованиями — в целом только 1/3 всех горизонтально приобретенных генов бифидобактерий получена ими от бактерий иных типов [10]; и в настоящее время известен только один безусловный патоген человека, относящийся к рассматриваемому семейству — *Gardnerella vaginalis*, получивший свою детерминанту вирулентности путем горизонтального переноса от микроорганизма, близкого *Streptococcus intermedius* [6]. У кишечных представителей рода *Bifidobacterium* к настоящему моменту «островов патогенности» не выявлено, несмотря на то, что известно несколько случаев выявления их вкуче с иными микроорганизмами при некоторых инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Что касается выявленных в данной работе различий в уровне внутривидовой генетической вариабельности между видами *B. bifidum* и *B. longum*, то они находятся в соответствии с известными данными и отражают более глубокую адаптацию вида *B. bifidum* к пищеварительному тракту млекопитающих, особенно в периоде молочного вскармливания [10].

В то же время, бифидобактерии, занимающие сходную с лактобациллами биохимическую нишу, характер эволюционной истории и диапазон размеров генома [5], имеют заметно большее удельное квадратичное количество генов регуляторных систем на размер генома: из 13 проанализированных видов у 12 лактобацилл его значение не превышает среднего для всех бактерий — 100, и только у *Lactobacillus delbrueckii* составляет 109. Что касается наиболее многочисленных облигатно анаэробных представителей нормального микробиоценоза толстого кишечника взрослого человека — бактерий рода *Bacteroides*, то, несмотря на вдвое больший размер генома и в 5 — 7 раз большее количество генов сенсорных гистидин-киназ, относительный «IQ-показатель» для них не превышает 90 единиц. Эта разница выгодно характеризует регуляторную эффективность генома бифидобактерий.

Таким образом, несмотря на то, что свойства геномов бифидобактерий отражают достаточно длительную и узкую специализацию ко вполне определенной экологической нише, сложное микроокружение биотопов хозяина, в которых приходится существовать бифидобактериям, вероятно, препятствует дальнейшему сокращению числа регуляторных сигнальных систем. Указанные факты, с одной стороны, показывают постоянство и предсказуемость реакций бифидобактерий на изменения состояния биотопа, сохраняя за ними полное право на роль важного индикатора его состояния, и делают все изученные в работе штаммы бифидобактерий типовыми моделями, пригодными для построения экспериментальных систем межмикробных взаимодействий. С другой стороны, несмотря на консервативность, репертуар доступных бифидобактериям адаптивных реакций должен быть шире, чем у более изученных прокариот-мутуалистов млекопитающих — лактобацилл, свидетельством чему может стать и способность бифидобактерий различать «своих» и «чужих» ассоциантов.

Авторы благодарят сотрудников Центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза к.м.н., А.О.Плотникова и к.б.н. Д.В.Пошвину за получение сиквенсных данных и д.т.н. Ю.А.Хлопко за их первичную обработку.

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине», проект № 18-7-8-34 и Российского Фонда Фундаментальных Исследований по программе поддержки фундаментальных научных исследований, выполняемых молодыми учеными («Мой первый грант»), проект № 18-34-00853 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Андриюшенко С.В. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопы толстого кишечника человека. Журн. микробиол. 2017, 1: 3-11.
2. Birnboim H.C., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979, 6: 1513-1523.
3. Claesson M.J., Cusack S., O'Sullivan O. et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. PNAS. 2011, 1: 4586-4591.
4. Galperin M.Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. BMC Microbiology. 2005, 5: 35.
5. Galperin M.Y., Higdon R., Kolker E. Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. Mol. BioSyst. 2010, 6: 721-728.
6. Gelber S.E., Aguilar J.L., Lewis K.L. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolyisin from *Gardnerella vaginalis*. J. Bacteriol. 2008, 11: 3896-3903.
7. Godson G.N., Vapnek D. A simple method of preparing large amounts of phiX174 RF 1 supercoiled DNA. Biochim Biophys Acta. 1973, 4: 516-520.
8. Ku S., Park M.S., Ji G.E., You H.J. Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism. Int.J. Mol.Sci. 2016, 9: 1544.
9. Maukonen J., Simxes C., Saarela M. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. FEMS Microbiol. Ecol. 2012, 3: 697-708.
10. Milani C., Turrone F., Duranti S. et al. Genomics of the Genus *Bifidobacterium* Reveals Species-Specific Adaptation to the Glycan-Rich Gut Environment. Appl. Environ. Microbiol. 2015, 4: 980-991.
11. O'Callaghan A., van Sinderen D. *Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota*. Front. Microbiol. 2016, 7: 925.
12. Ott S.J., Musfeldt M., Timmis K.N. et al. In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2004, 4: 237-245.
13. Tavender T.J., Halliday N.M., Hardie K.R. et al. LuxS-independent formation of AI-2 from ribulose-5-phosphate. BMC Microbiol. 2008, 8: 98.
14. Ventura M., Turrone F., Lugli G.A. et al. *Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives*. J.Sci.Food.Agric. 2014, 94: 163-168.
15. Wolf Y.I., Koonin E.V. Genome reduction as the dominant mode of evolution. Bioessays. 2013, 9: 829-837.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

В.М.Червинец, Ю.В.Червинец, Е.А.Беляева, О.А.Петрова, Е.Б.Ганина

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОАНТАГОНИСТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ ЗДОРОВОГО ЧЕЛОВЕКА

Тверской государственный медицинский университет

Цель. Оценить метаболическую активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта и кишечника здоровых людей. *Материалы и методы.* В исследование включены 9 высокоантагонистически активных штамма лактобацилл, выделенных из зубного налета и кишечника здоровых людей разных возрастных групп от 8 до 35 лет. У лактобацилл были изучены ферменты патогенности, кислотообразование, газовые сигнальные молекулы (CH₄, CO₂, C₂H₆, CO и NH₃), а также степень чувствительности к соляной кислоте, желчи. *Результаты.* Все исследуемые штаммы лактобацилл были генетически идентифицированы по гену 16S РНК и отнесены к 4 видам: *L.fermentum*, *L.rhamnosus*, *L.plantarum* и *L.casei*. Они оказались апатогенными, вырабатывали широкий спектр метаболитов разной степени выраженности: молочную кислоту и простые газовые сигнальные молекулы, CH₄, CO₂, C₂H₆, CO и NH₃. Кишечные

штаммы лактобацилл были в большей степени устойчивы к соляной кислоте и желчи, чем лактобациллы, выделенные из полости рта. *Заключение.* Высокоантагонистические штаммы лактобацилл имеют широкий спектр пробиотических факторов, синтезируют кислоты и газообразные молекулы, выживают в присутствии соляной кислоты и желчи, и поэтому могут быть рассмотрены для конструирования новых пробиотиков и функциональных продуктов питания.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 11—17

Ключевые слова: лактобациллы, полость рта, кишечник, кислотопродукция, персистенция, сигнальные молекулы

V.M.Chervinets, Yu.V.Chervinets, E.A.Belyaeva, O.A.Petrova, E.B.Ganina

METABOLIC ACTIVITY OF HIGH-ANTAGONISTIC STRAINS OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM HEALTHY PEOPLE

Tver State Medical University, Russia

Aim. To evaluate the metabolic activity of highly antagonistic strains of lactobacilli isolated from the oral cavity and intestine of healthy people. *Materials and methods.* 9 highly antagonistically active strains of lactobacilli isolated from plaque and intestine of healthy people of different age groups from 8 to 35 years were included in the study. Enzymes of pathogenicity, acidproduction, gasotransmitters (CH₄, CO₂, C₂H₆, CO и NH₃) were studied in lactobacilli, as well as the degree of sensitivity to hydrochloric acid and bile. *Results.* All antagonistic strains of lactobacilli have been identified by 16S rRNA sequencing and assigned to 4 species: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus casei*. All lactobacilli were apatogenic, producing a wide range of metabolites of varying severity: lactic acid and gasotransmitters, CH₄, CO₂, C₂H₆, CO и NH₃. It was found that intestinal strains of lactobacilli were resistant to hydrochloric acid and bile than lactobacilli isolated from oral cavity. *Conclusion.* Highly antagonistic strains of lactobacilli have a wide spectrum of probiotic factors, they synthesize acids and gasotransmitters, persist in the presence of hydrochloric acid and bile, and therefore they should be considered in the creation of new probiotics and functional products.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 11—17

Key words: lactobacilli, oral cavity, intestine, acid production, persistence, gasotransmitters

ВВЕДЕНИЕ

Лактобациллы, являясь представителями нормальной микрофлоры организма человека и заселяя различные биотопы, участвуют в защитных механизмах желудочно-кишечного тракта [2, 5, 14]. Жизнедеятельность пробиотических штаммов лактобацилл обеспечивается не только факторами, позволяющими адаптироваться к новой экологической нише, но и продуцируемыми ими метаболитами, характеризующими их пробиотический потенциал, напрямую способствующий проявлению положительного воздействия лактобацилл [6].

Пробиотический потенциал включает в себя способность к подавлению роста нежелательных микроорганизмов в пищеварительном тракте хозяина, позитивное взаимодействие с автохтонной микробиотой и с эпителием кишечника, улучшающее местный иммунитет, и наконец, взаимодействие с клетками организма хозяина и активацию метаболических и иных процессов, локализованных или протекающих вне желудочно-кишечного тракта. Все

эффекты симбиотической микрофлоры и пробиотических микроорганизмов обусловлены продукцией ими различных микробных низкомолекулярных соединений, потенциально способных участвовать в физиологических функциях, метаболических, сигнальных, поведенческих реакциях и межклеточном обмене информацией. Среди них наиболее изученными являются летучие жирные и другие органические кислоты, лактоны, пептидные феромоны, фураноны и другие аутоиндукторы, участвующие в реализации кворум-сенсинг феномена, белки, АТФ и другие соединения, продуцируемые при стрессовых воздействиях, различные белки, пептиды и аминокислоты, разнообразные простейшие метаболиты микробных клеток (CH_4 , H_2S , NO , CO , H_2O_2 и т. д.), нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, нуклеозиды, витамины (большинство из группы В, биотин, фолиевая и пантотеновая кислоты, витамин К), амины, полиамины, гормон-схожие субстанции, нейротрансмиттеры, полисахариды, олигосахариды, пептидогликаны, липотейхоевые кислоты, гликопептиды, липополисахариды, антимикробные соединения различной химической природы, лектины, биосурфактанты, пигменты и т. д. [7, 10].

Цель работы: оценить метаболическую активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта и кишечника здоровых людей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из 300 выделенных штаммов лактобацилл из полости рта и кишечника были отобраны только 9 штаммов, обладающих высоким антагонизмом к патогенной и условно патогенной микробиоте. Материалом для исследования являлись 9 штаммов лактобацилл, выделенных от здоровых людей (5 из зубного налета, 4 — из содержимого кишечника) разных возрастных групп от 8 до 35 лет. Все здоровые люди на момент обследования были клинически здоровы, не имели в анамнезе инфекционных и соматических заболеваний желудочно-кишечного тракта и других систем органов. Критерий отбора лактобацилл — наличие высокой антагонистической активности по отношению к производственным штаммам *Candida albicans* ATCC 885-653, *Salmonella typhimurium* 415, *Shigella sonnei* I фазы 941, *Bacillus subtilis* 534 (из коллекции музейных культур НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Москва), *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* 209 (из государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А.Тарасевича).

Биохимическую идентификацию проводили, используя тест-систему *api* 50 CH «bio Mérieux» (Франция) по цифровому профилю, используя программу API WEB для ПК. Штаммы не подвергались генно-инженерным воздействиям. Генетическую идентификацию проводили на базе лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики им. Н.И.Вавилова. Для определения вида по гену 16S РНК использовали стандартные праймеры 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) и 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) и систему BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), ожидаемый размер ПЦР-фрагментов — 1465 пн [4].

Наличие ферментов патогенности лактобацилл (лецитиназной, казеинолитической, желатиназной, нуклеазной, каталазной, гемолитической, антилизотимной активности) и продукцию молочной кислоты определяли по традиционной методике [1, 12]. Чувствительность к соляной кислоте и желчи оценена по изменению оптической плотности (ОП) суточной бульон-

ной культуры лактобацилл в МРС бульоне на спектрофотометре КФК-3 при длине волны 600 нм [9].

Определение газовых сигнальных молекул (CH_4 , CO_2 , C_2H_6 , CO , C_3H_8) проводилось методом газовой хроматографии с применением газового хроматографа «Кристаллюкс 5000М», оснащенного детектором по теплопроводности и пламенно-ионизационным детектором, подключенными последовательно, что обеспечивало одновременный анализ горючих и негорючих компонентов. Продукция аммиака (NH_3) определялась по фотометрическому методу с использованием реактива Нesslerа методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель» [3].

Для систематизации полученных данных создана база данных в формате Excel, материал обрабатывался программой Statistica. Вычисляли средние значения, стандартное отклонение, стандартную ошибку. Значения $p < 0,02$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенной биохимической и генетической идентификации по гену 16S rPHK 9 антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных от здоровых людей разных возрастных групп, выявлена их принадлежность к следующим родам: *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*. Из полости рта здоровых людей были селекционированы следующие штаммы лактобацилл: *L. fermentum* 2 п.рта, *L. fermentum* 11 зв., *L. fermentum* 11 д.ст., *L. rhamnosus* 24 д.ст., *L. rhamnosus* 7 д.ст.; из кишечника — *L. rhamnosus* 38 к., *L. rhamnosus* 32 к., *L. plantarum* 46 к. и *L. casei* 17 к.

У 9 штаммов лактобацилл обнаружено отсутствие ассоциированных с синтезом ферментов патогенности каталазной активности, микробных протеаз (казеиназа и желатиназа), нуклеазной активности (ДНКаза и РНКаза), гемолитической, антилизоцимной и лецитиназной активности.

Исследована активность кислотообразования у 9 штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта и кишечника здоровых людей, которая характеризовалась разной степенью продукции кислоты в зависимости от присутствия глюкозы в качестве питательного субстрата.

Четыре штамма лактобацилл (*L. fermentum* 11 зв., *L. rhamnosus* 24 д.ст., *L. rhamnosus* 7 д.ст. и *L. fermentum* 11 д.ст.), выделенные из полости рта, характеризовались постепенным увеличением продукции кислоты как в присутствии глюкозы, так и без нее, причем кислотопродуцирующая способность 2 из них (*L. fermentum* 11 зв., *L. rhamnosus* 24 д.ст.) имела большую тенденцию к нарастанию под действием глюкозы. У одного штамма (*L. fermentum* 2 п.рта) только присутствие в питательном субстрате глюкозы стимулировало в течение 3 суток кислотопродукцию. Один штамм (*L. rhamnosus* 38 к.), выделенный из кишечника, характеризовался постепенным увеличением продукции кислоты как в присутствии глюкозы, так и без нее. У 2 штаммов (*L. plantarum* 46 к., *L. casei* 17 к.) только присутствие в питательном субстрате глюкозы стимулировало в течение 3 суток кислотопродукцию. Один штамм (*L. rhamnosus* 32 к.) характеризовался постепенным увеличением продукции кислоты в течение 2 и 3 суток без добавления глюкозы, а присутствие глюкозы привело к продукции кислоты только на 3 сутки. Таким образом, присутствие глюкозы незначительно стимулировало продукцию молочной кислоты лактобациллами ($p < 0,05$).

Чувствительность лактобацилл к соляной кислоте и желчи, которая во многом определяет способность к персистенции в ЖКТ, определяли по изменению оптической плотности (ОП) суточной бульонной культуры, в зависимости от концентрации соляной кислоты или желчи.

Результаты показывают, что для трех штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта (*L. fermentum* 11 зв., *L. rhamnosus* 7 д.ст. и *L. fermentum* 2 п.рта), минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соляной кислоты составляет 0,475%, а для двух других штаммов (*L. rhamnosus* 24 д.ст. и *L. fermentum* 11 д.ст.) — 0,95%. Выявлено, что для 3 штаммов лактобацилл, выделенных из кишечника (*L. plantarum* 46 к., *L. rhamnosus* 38 к. и *L. rhamnosus* 32 к.) МИК соляной кислоты составляла 1,25%, а для *L. casei* 17 к. — 2,5%.

Выявлено, что желчь в концентрациях 20% ингибирует размножение и рост бульонной культуры штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта (*L. fermentum* 11 зв., *L. rhamnosus* 24 д.ст. и *L. fermentum* 11 д.ст.). Для штамма *L. rhamnosus* 7 д.ст. ингибирующими концентрациями желчи являются 20 и 10%. Штамм *L. fermentum* 2 п.рта не подвержен влиянию желчи в любой концентрации. Для двух кишечных штаммов *L. rhamnosus* 38 к. и *L. rhamnosus* 32 к. ингибирующей концентрацией желчи было 0,625%. Желчь в концентрациях 10% ингибировала размножение и рост бульонной культуры *L. plantarum* 46 к., а в концентрации 5% — *L. casei* 17 к.

Было выявлено, что *L. fermentum* 11 зв. выделяет в небольшом количестве CO_2 и CO , а также аммиак, и при повторных измерениях его количество практически не изменялось; продукция метана, пропана и этана не определялась. Штамм *L. rhamnosus* 24 д.ст. выделял CH_4 , CO_2 , C_2H_6 и CO , а также аммиак, а при повторном измерении его количество снижалось; продукция пропана не определялась. Штамм *L. rhamnosus* 7 д.ст. выделял CH_4 , CO_2 и C_2H_6 , а также аммиак, а при повторных измерениях его количество снижалось; продукция угарного газа и пропана не определялась. Штаммы *L. fermentum* 2 п.рта и *L. fermentum* 11 д.ст. выделяли только CO_2 , а также аммиак, а при повторных измерениях его количество увеличивалось. Кишечный штамм *L. casei* 17 к. выделял CH_4 , CO_2 , C_2H_6 , CO и NH_3 , продукция пропана не определялась. Кишечные штаммы *L. rhamnosus* 32 к. и *L. plantarum* 46 к. выделяли CH_4 , CO_2 , C_2H_6 и CO , но не выделяли пропан и аммиак. Кишечный штамм *L. rhamnosus* 38 к. выделял CO_2 , CO и NH_3 , но не выделял метан, этан и пропан.

ОБСУЖДЕНИЕ

Лактобациллы, принадлежащие к микробиоте ЖКТ макроорганизма, характеризуются не только большим разнообразием, но и обладают широкой антимикробной и функциональной пробиотической активностью, участвующей в защитных механизмах желудочно-кишечного тракта [11]. В исследовании использовали 9 штаммов лактобацилл, *L. fermentum* (3 штамма), *L. rhamnosus* (4), *L. plantarum* (1) и *L. casei* (1), выделенных из полости рта и кишечника здоровых людей, обладающих выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов.

Исследуемые штаммы лактобацилл имели широкий спектр пробиотических факторов: синтез кислот, газообразных молекул, чувствительность к соляной кислоте и желчи. В частности, основной антимикробный компонент, продуцируемый лактобациллами, это молочная кислота, производство которой характеризуется родо- и видоспецифичностью бактерий, а в соот-

ветствии с нашими данными содержание глюкозы в среде дополнительно стимулирует кислотопродукцию лактобациллами. Ферменты, связанные с патогенностью, не были выявлены у наших штаммов, что косвенно указывает на то, что эти бактерии являлись авирулентными. Известно, что устойчивость лактобацилл к факторам защиты ЖКТ определяется их отношением к соляной кислоте и желчи. Наши результаты показали высокую выживаемость лактобацилл в присутствии соляной кислоты и желчи, которая указывает на их способность к долговременной стойкости в ЖКТ.

Анализ данной литературы указывает на важную роль газотрансмиттеров (CH_4 , CO_2 , C_2H_6 , CO и NH_3) во внутри- и межвидовой микробной коммуникации, а также в диалоге микробиота-хозяин. Известна роль этого взаимодействия на здоровье человека, его влияние на психику человека и социальное поведение, а также возможность создания пробиотических препаратов с нейрорхимическим эффектом [8, 13, 15]. Наше исследование впервые выявило несколько штаммов лактобацилл, продуцирующих микромолярные концентрации некоторых газообразных продуктов. Все лактобациллы, выделенный из ротовой полости, синтезируют CO_2 и NH_3 . Помимо этих газов каждый штамм лактобацилл полости рта может дополнительно выделять CH_4 , C_2H_6 или CO . Все кишечные изоляты лактобацилл продуцировали CO_2 и CO , в дополнение к ним каждый из штаммов лактобацилл кишечника мог образовывать CH_4 , C_2H_6 или NH_3 .

Полученные данные показывают, что селекционированные антагонистические штаммы лактобацилл, выделенные из кишечника и полости рта здоровых людей, обладают пробиотическим потенциалом, потому что они обладают рядом адаптационных и пробиотических свойств. Их можно использовать для конструирования новых пробиотиков и функциональных продуктов питания. Пробиотики и функциональные пищевые продукты, разработанные на основе вышеуказанных штаммов лактобацилл, также могут быть источником газообразных веществ, способных действовать как медиаторы различных положительных эффектов на различные ткани и органы макроорганизма посредством иммунологических, биохимических и нейроэндокринных механизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агапова О.В., Бондаренко В.М., Поликарпов Н.А. Ферменты патогенности клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Журн. микробиол. 1999, 2: 5-8.
2. Гаврилова О.А., Червинец Ю.В. Содержимое зубодесневого желобка у дошкольников: физические и микробиологические характеристики. Стоматология детского возраста и профилактика. 2009, 2: 66-68.
3. ГОСТ 33045-2014. Метод капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». ПНД Ф 14.1:2:4.167-2000. М., 2000.
4. Червинец Ю.В. и др. Генетическая идентификация антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта здоровых людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2010, 11: 43-46.
5. Червинец Ю.В. и др. Индигенные лактобациллы полости рта человека — кандидаты в пробиотические штаммы. Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». 2012, 1: 131-137.
6. Червинец В.М. и др. Пробиотический и адаптационный потенциал лактобацилл, перспективных для конструирования эффективных пробиотических препаратов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016, 126 (2): 108.
7. Шендеров Б.А. Роль эндогенных и микробных газовых молекул в физиологии патофизиологии сердечно-сосудистой системы. Вестник восстановительной медицины. 2015, 5: 58-65.

8. Althaus M., Clauss W.G. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. *Front Physiol.* 2013, 4: 27. doi:10.3389/fphys.2013.00027.
9. Casey P.G., Casey G.D., Gardiner G.E. et al. Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004, 39: 431-438.
10. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 2008, 72: 728-764.
11. Mikelsaar M., Sepp E., Stsepetova J. et al. Biodiversity of Intestinal Lactic Acid Bacteria in the Healthy Population. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.* 2016, 4: 1-64. doi 10.1007/5584_2016_3.
12. MU 2.3.2.2789-10 Guidelines for the sanitary-epidemiological assessment of the safety and functional potential of probiotic microorganisms used for food production. *Food Raw Materials and Food Products.* 2010, Moscow (in Russia).
13. Shenderov B.A. Probiotics and Functional Foods, 2011. In *Food Engineering, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK. (<http://www.eolss.net>).
14. Sasithorn Sirilun, Chaiyavat Chaiyasut, Duangporn Kantachote, Plearnpis Luxananil Characterisation of non-human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *African J. Microbiology Research.* 2010, 4 (10): 994-1000.
15. Tinajero-Trejo M., Jesse H.E., Poole R.K. Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Report.* 2013, 5: 28. doi:10.12703/P5-28.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.С.Ворошила^{1,2}, *Д.Л.Зорников*¹, *Л.Г.Боронина*¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

¹Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург; ²ООО Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург

Цель. Сравнить видовой состав вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с помощью ПЦР в реальном времени в отделяемом репродуктивного тракта до и после культивирования микроорганизмов на кровяно-дрожжевом сывороточном агаре (КДСА). *Материалы и методы.* Методом ПЦР в режиме реального времени исследован видовой состав вагинальных лактобацилл в образцах от 25 условно здоровых женщин репродуктивного возраста. В качестве исследуемого материала использовали образцы отделяемого репродуктивного тракта (соскобы из влагалища и цервикального канала). Видовую идентификацию лактобацилл проводили дважды: в нативном клиническом материале и в образцах, полученных после культивирования вагинальных микроорганизмов на КДСА. *Результаты.* После культивирования влагалищных микроорганизмов на КДСА всего в 2 (8%) случаях отмечали преобладание *L. iners*, тогда как при исследовании нативного материала данный вид в качестве преобладающего выявляли в 10 (40%) образцах. *Заключение.* При культивировании лактобацилл на КДСА наблюдается замедленный рост *L. iners* в сравнении с другими видами вагинальных лактобацилл. Культуральное исследование для определения доминирующего вида лактобацилл оказалось неэффективным в случае доминирования *L. iners* — вида, ассоциированного с повышенным риском развития дисбиоза влагалища.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 17—21

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, вагинальные лактобациллы, вагинальный дисбиоз, нормоценоз, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, ПЦР в реальном времени

RESULTS OF DETERMINING THE SPECIES COMPOSITION OF VAGINAL LACTOBACILLI USING REAL-TIME PCR TESTING AND BACTERIOLOGICAL METHOD

¹Ural State Medical University, Yekaterinburg; ²«Garmonia» Medical Centre, Yekaterinburg, Russia

Aim. To compare the species composition of lactobacilli in women of reproductive age using real time PCR on urogenital samples before and after culturing microorganisms in Blood-Serum-Yeast extract-Agar (BSYA). *Materials and methods.* Using real time PCR, we have examined the species composition of vaginal lactobacilli in 25 healthy women of reproductive age. Samples of urogenital swabs (endocervical and vaginal swabs) were studied. Species identification has been carried out twice: in the native clinical material and in the samples received after using microorganism culture technique in BSYA. *Results.* After culturing vaginal microorganisms in BSYA, *L. iners* predominance was found only in 2 cases (8%). At the same time, when using native clinical material this species predominance was discovered in 10 samples (40%). *Conclusion.* When culturing lactobacilli in BSYA, the growth of *L. iners* is stunted compared to other species of vaginal lactobacilli. The use of cultural testing turned out to be ineffective in case of predominance of *L. iners*, the species associated with an increased risk of vaginal dysbiosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 17–21

Key words: vaginal microbiocenosis, vaginal lactobacilli, vaginal dysbiosis, normocenosis, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, real-time PCR

ВВЕДЕНИЕ

Вклад микробов-комменсалов, особенно бактерий рода *Lactobacillus*, в поддержание колонизационной резистентности влагалища и репродуктивного здоровья в целом на сегодняшний день признается всеми исследователями и практикующими врачами. Неоднократно было показано, что снижение количества лактобацилл или их отсутствие во влагалище повышает вероятность инфицирования возбудителями инфекций, передаваемых половым путем, и увеличивает риск развития осложнений беременности [4, 6, 9, 11 – 13]. В рамках проекта «Human microbiome» было продемонстрировано, что населяющие влагалище микроорганизмы колонизируют новорожденного в случае естественных родов [7], что в последующем во многом определяет формирование микробиоты всех локализаций. Исследования, проведенные по всему миру, убедительно демонстрируют наличие связи между определяемыми во влагалище видами лактобацилл и риском развития дисбиоза [5, 14, 15]. Нами было показано, что в качестве индикатора стабильности вагинального микробиоценоза можно использовать преобладающий во влагалище вид лактобацилл, определяемый с помощью метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [2]. Однако при этом возникает вопрос, насколько возможно использовать эти же критерии при проведении рутинного культурального исследования.

В связи с изложенным, целью настоящей работы явилось сравнение видового состава вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с помощью ПЦР в реальном времени в отделяемом репродуктивного тракта до и после культивирования микроорганизмов на кровяно-дрожжевом сывороточном агаре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были отобраны 25 условно здоровых женщин репродуктивного возраста, микроскопическая картина вагинального отделяемого у которых соответствовала критериям нормоценоза [3].

С помощью стерильных тампонов отбирали образцы отделяемого репродуктивного тракта (соскобы из влагалища и цервикального канала). Материал одновременно помещали в пробирку со стерильным физиологическим раствором для определения видовой принадлежности *Lactobacillus* spp. методом ПЦР-РВ и в транспортную среду Amies для проведения культурального исследования.

Посев клинического материала для выделения и последующей идентификации культур влагалищных микроорганизмов, в том числе лактобацилл, осуществляли на кровяно-дрожжевой сывороточный агар (КДСА) [1]. После 24-48 часов культивирования отбирали все типичные для лактобацилл колонии и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе. В полученном материале повторно проводили видовую идентификацию вагинальных лактобацилл методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем для научного применения компании ДНК-Технология. Наборы позволяли идентифицировать и определить количество 7 видов лактобацилл: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. johnsonii*.

Основным критерием оценки вагинальной лактофлоры являлся преобладающий вид лактобацилл. В качестве преобладающего принимали тот, доля которого была наибольшей среди всех идентифицированных видов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании отделяемого репродуктивного тракта методом ПЦР-РВ выявляли все виды лактобацилл, кроме *L. acidophilus*, однако в качестве преобладающих определяли только четыре: *L. crispatus* в 11 (44%), *L. iners* в 10 (40%), *L. gasseri* в 3 (12%), *L. jensenii* в 1 (4%) из 25 образцов. В дальнейшем для удобства описания выделили 4 основных группы женщин на основании преобладающего вида лактобацилл (в абсолютных цифрах): группа 1 (преобладающий вид *L. crispatus*, n=11), группа 2 (преобладающий вид *L. iners*, n=10), группа 3 (преобладающий вид *L. jensenii*, n=1), группа 4 (преобладающий вид *L. gasseri*, n=3).

Определение видовой принадлежности с помощью ПЦР-РВ культуры лактобацилл, полученной на КДСА, продемонстрировало изменение количественных соотношений между разными видами лактобацилл в одной культуре по сравнению с картиной в нативном материале. Следствием этого стала смена преобладающего вида среди идентифицированных. В 8 (32%) из 25 образцов преобладающий вид лактобацилл в культуре, полученной на КДСА, отличался от такового в нативном материале. Что примечательно, у всех 8 пациенток при исследовании первичного материала в качестве преобладающего вида выявляли *L. iners*. Если преобладал любой другой вид лактобацилл, то именно его выявляли в качестве преобладающего и после культивирования.

В большинстве случаев при культивировании лактобацилл на КДСА отмечали опережающий рост других видов в сравнении с *L. iners*. Это в конечном итоге приводило к тому, что в ПЦР-РВ обнаруживалось больше копий ДНК видов *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, чем *L. iners*. При этом после культивирования абсолютное количество *L. iners* в половине случаев составляло не менее 10^5 ГЭ/мл. Однако это в десятки-сотни раз меньше в сравнении с количеством других видов.

В качестве примеров можно продемонстрировать результаты двух исследований. В пробе 432 количество *L. iners* при исследовании первичного клинического материала составляло $10^{6.7}$ (99% от суммарного количества лактобацилл в образце). После культивирования абсолютное количество *L. iners* осталось прежним — $10^{6.7}$, однако количество *L. jensenii* и *L. crispatus* возросло до $10^{7.6}$ и $10^{7.4}$ (55% и 34% удельного веса) соответственно. В итоге доля *L. iners* после культивирования составила лишь 7% от суммарного количества лактофлоры. В пробе 957 после культивирования совсем не обнаруживали *L. iners*, хотя в нативном материале выявляли данный вид в количестве $10^{7.8}$ (99% от суммарного количества лактобацилл в образце).

Обнаружение и преобладание отдельных видов лактобацилл во влагалище женщин репродуктивного возраста является дополнительным маркером устойчивости микробиоценоза к воздействию различных факторов окружающей среды [1, 14, 15]. Обнаружение *L. crispatus* коррелирует с нормоценозом и низким содержанием микроорганизмов, ассоциированных с дисбиозом влагалища. Тогда как преобладание *L. iners*, особенно при отсутствии *L. crispatus*, является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о повышенном риске развития дисбиоза влагалища. Следовательно, исследование видового состава вагинальных лактобацилл и определение преобладающего среди них вида является прогностически значимым. При этом возникает вопрос об информативности отдельных методик исследования видового состава лактофлоры. Традиционно считается, что «золотым стандартом» для идентификации бактерий является культуральное исследование. Однако применительно к вагинальным лактобациллам еще в 1980 году была отмечена невозможность идентификации вида внутри комплекса *Lactobacillus acidophilus* по биохимическим признакам [10]. Вместе с тем, было установлено, что часто выявляемый вид *L. iners* не культивируется на селективных для лактобацилл питательных средах (агар Рогоза, MRS агар) [8]. Для выделения *L. iners* было предложено использовать кровяной агар — КА [8].

В настоящем исследовании было установлено, что *L. iners* хуже других лактобацилл растет на используемой для выделения вагинальных микроорганизмов питательной среде — КДСА. Следовательно, первичное выделение лактофлоры на КДСА и, возможно, на КА во многих случаях может приводить к искажению действительной картины и гиподиагностике *L. iners*, преобладание которого ассоциировано с развитием дисбиоза влагалища.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Патент РФ № 2011128466/10, 08.07.2011. Питательная среда для выделения, культивирования и определения гемолитических свойств бактерий из клинического материала. Патент России № 2481394 С2. 2013. Бюл. №13.
2. Зорников Д.Л., Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015, 4 (55): 99-105.
3. Кира Е.Ф., Бактериальный вагиноз. Санкт-Петербург, 2001.
4. Atashili J., Poole C., Ndumbe P.M. et al. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS. 2008 Jul 31;22(12):1493-501.
5. Balashov S.V., Mordechai E., Adelson M.E. et al. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2014 Apr;78(4):321-327.
6. Brotman R.M., Klebanoff M.A., Nansel T.R. et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J. Infect. Dis. 2010, 202:1907-1915.

7. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010 Jun 29;107(26):11971-11975.
8. Falsen E., Pascual C., Sjoden B. et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49:217-221.
9. Haggerty C.L., Hillier S.L., Bass D.C. et al. PID Evaluation and Clinical Health study investigators. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin. Infect. Dis.* 2004 Oct 1;39(7):990-995.
10. Lauer E., Helming C., Kandler O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Møcquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. Abt.* 1980, 1:150-168.
11. Martin H.L., Richardson B.A., Nyange P.M. et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 1999, 180(6):1863-1868.
12. Ness R.B., Kip K.E., Hillier S.L. et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am. J. Epidemiol.* 2005 Sep 15;162(6):585-590.
13. Rathod S.D., Krupp K., Klausner J.D. et al. Bacterial vaginosis and risk for *Trichomonas vaginalis* infection: a longitudinal analysis. *Sex. Transm. Dis.* 2011 Sep;38(9):882-886.
14. Tamrakar R., Yamada T., Furuta I., et al. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect. Dis.* 2007 Nov 7;7:128.
15. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G. et al. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 2009 Jun 2;9:116.

© А.В.СГИБНЕВ, Е.А.КРЕМЛЕВА, 2018

А.В.Сгибнев¹, Е.А.Кремлева^{1,2}

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА МЕТАБОЛИТАМИ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Оценка влияния метаболитов вагинальных лактобацилл на ферментативную и бактерицидную активность лизоцима. *Материалы и методы.* Изучали изменение ферментативной и бактерицидной активности лизоцима после его обработки бесклеточными супернатантами лактобацилл, содержащих сурфактанты, пероксид водорода или их комбинацию. Ферментативную активность оценивали по скорости лизиса *Micrococcus luteus*, бактерицидность для тест-штаммов *Escherichia coli* и *Lactobacillus acidophilus* — по результатам посева. *Результаты.* Ферментативную активность лизоцима снижали как сурфактанты, так и H₂O₂. Под влиянием сурфактантов бактерицидная активность лизоцима снижалась и в отношении *L. acidophilus*, и *E. coli*. Под влиянием пероксида водорода и его сочетаний с сурфактантами бактерицидная активность лизоцима в отношении *L. acidophilus* снижалась, а в отношении *E. coli* повышалась. Низкие концентрации сурфактантов потенцировали влияние H₂O₂ на антибактериальную активность лизоцима. *Заключение.* Делается вывод о том, что метаболиты нормальной микрофлоры являются инструментом модификации факторов защиты хозяина с целью создания благоприятных условий собственного существования и препятствия интродукции чужеродных видов.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 21—27

Ключевые слова: лактобациллы, лизоцим, пероксид водорода, сурфактанты, факторы врожденного иммунитета

VAGINAL LACTOBACILLI REGULATE THE ACTIVITY OF MURAMIDASE VIA HYDROGEN PEROXIDE AND SURFACTANTS

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. Evaluation of the effect of metabolites of vaginal lactobacilli on the enzymatic and bactericidal activity of muramidase. *Materials and methods.* We investigated how the enzymatic and bactericidal activity of muramidase changes after treatment with supernatants of lactobacilli containing surfactants, hydrogen peroxide, or a combination thereof. The enzymatic activity was measured by the rate of *Micrococcus luteus* lysis, bactericidal activity for test strains of *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus* by results of seeding on agar plates. *Results.* The hydrogen peroxide and surfactants reduced the enzymatic activity of lysozyme. Bactericidal activity of lysozyme against *L. acidophilus* and *E. coli* was decreased under the influence of surfactants. Hydrogen peroxide and its combinations with surfactants decreased bactericidal activity of lysozyme against *L. acidophilus* and increased for *E. coli*. Low concentrations of surfactants potentiated the effect of H₂O₂ on the antibacterial activity of lysozyme. *Conclusion.* It is concluded that the metabolites of the normal microflora is a implement for modification of host defense factors in order to create favorable conditions for its own existence, and prevent introduction of allochthonous species.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 21—27

Key words: lactobacilli, lysozyme, hydrogen peroxide, surfactants, innate immunity factors

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что препятствие интродукции чужеродных видов в женском репродуктивном тракте обеспечивается действиями как со стороны организма хозяина, так и его нормальной микрофлоры [12, 14]. Несмотря на то, что многообразные механизмы реализации этого феномена длительное время являются объектом пристального внимания исследователей [12, 14], парадоксальным остается тот факт, что факторы защиты, в концентрациях, не оказывающих заметного антимикробного эффекта *in vitro*, в условиях *in vivo* подавляют патогенов, не угнетая нормофлору [15]. В какой-то мере, это объясняется способностью нормофлоры, в частности вагинальных лактобацилл, повышать активность антимикробных пептидов хозяина за счет продукции пероксида водорода [10]. Однако, помимо пероксида водорода, продукция которого присуща не всем лактобациллам, эти представители вагинальной нормофлоры синтезируют массу других метаболитов [5], также потенциально способных модифицировать активность факторов естественной резистентности хозяина [3, 7]. В число таких метаболитов входят сурфактанты, для которых показана способность изменять конформацию и активность белков [6]. В связи с этим, мы сочли актуальным изучить влияние различных метаболитов вагинальных лактобацилл на активность антимикробных пептидов хозяина, так как, с одной стороны, это может расширить представления о механизмах колонизационной резистентности женского репродуктивного тракта, с другой стороны, иметь прикладное значение.

Это определило цель нашего исследования: оценка влияния сурфактантов, пероксида водорода, а также их комбинаций, продуцируемых лактобациллами, на ферментативную и антибактериальную активность лизоцима в отношении представителей нормальной (*L. acidophilus*) и условно патогенной (*E. coli*) микрофлоры влагалища.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Escherichia coli* ГИСК №240367, *Lactobacillus acidophilus* ИКВС №37 и 20 изолятов лактобацилл из репродуктивного тракта здоровых женщин, идентифицированных с использованием коммерческих наборов API50CH test kit (bioMerieux, La Balme les Grottes, France), согласно рекомендациям производителя.

Для получения бесклеточных супернатантов лактобациллы выращивали 72 часа в 500 мл колбах с 200 мл среды MRS (HiMedia) при 37°C и перемешивании (100 об/мин) в атмосфере с 5% CO₂. Бактерии осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин), двукратно отмывали в 100 мл ФСБ (10 mM K₂HPO₄/K₂HPO₄ и 150 mM NaCl, pH = 7,0, 10 000 g, 10 мин) и готовили взвесь (~10⁷ КОЕ/мл) в стерильной среде (0,8 mM MgSO₄, 0,3 mM MnSO₄, 11,5 mM K₂HPO₄ и 11,5 mM глюкозы, pH=7,0). Взвесь инкубировали 4 часа в аэробных условиях (37 °С, 100 об/мин), бактерии удаляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин), полученные супернатанты стерилизовали фильтрованием (0,22 μm, Millipore).

Производство сурфактантов оценивали по наличию эмульгирующей активности (ЭА) супернатантов по описанной ранее методике [13]. Эмульгирующую активность оценивали количественно через 6 часов по формуле: ЭА=(Нэ/Но)×100, где ЭА — эмульгирующая активность, у.е., Нэ — высота эмульсии, мм, Но — общая высота эмульгированного и неэмульгированного толуола, мм.

Определение содержания H₂O₂ в метаболитах лактобацилл проводили по описанному методу [10] с изменениями: для этого в лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл супернатантов и раствора, содержащего 5мМ тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) и 0,5 U/мл пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich) в цитратнофосфатном буфере (pH=4,5). Калибровочные пробы готовили на основе вышеописанной среды. Реакцию останавливали через 5 минут инкубации при 25°C добавлением 50 мкл 5% раствора H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность (λ=450 нм).

Для оценки влияния метаболитов лактобацилл на ферментативную и бактерицидную активности яичного лизоцима (M=14,7 кДа, Sigma-Aldrich) супернатанты смешивали с равным объемом раствора лизоцима (200 мкг/мл в 0,1 М ФСБ (pH=6,2)), в контроле использовали метаболиты лактобацилл, предварительно обработанные каталазой (8 U/мл, Sigma-Aldrich), смесью хлороформ:метанол (2:1 об/об), протеазой К (20 мг/мл) и трипсином (20 мг/мл) для удаления из них H₂O₂, сурфактантов или бактериоцинов соответственно. Для исключения влияния молочной и других кислот на лизоцим кислотность всех супернатантов доводили 6 N NaOH до pH=6,2.

Ферментативную активность лизоцима определяли по скорости лизиса *M. luteus* [1]. Активность лизоцима выражали в у.е./мг белка в минуту. За единицу активности фермента принимали уменьшение на 0,01у.е. оптической плотности взвеси *M. luteus*. Концентрацию белка в препаратах лизоцима определяли по Лоури [11].

Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) нативного или модифицированного метаболитами лактобацилл лизоцима к взвеси *L. acidophilus* и *E.coli* (~10⁵ КОЕ/мл в 0,1 М ФСБ, pH=6,2) добавляли равный объем раствора лизоцима в различных концентрациях, инкубировали в течении часа при 37°C и высевали *E.coli* на агаризованную среду Эндо, *L. acidophilus* — на MRS. Результаты посева учитывали через сутки культивирования при 37°C в микроаэрофильных условиях. Значения МБК выражали в мкг/мл.

Экспериментальные данные представлены в виде средних арифметических трех независимых серий экспериментов (М) и стандартных ошибок средних (m). Для оценки достоверности различий между группами использовался критерии Манна-Уитни и согласия Пирсона (χ^2). Исследование взаимосвязи между признаками осуществляли при помощи коэффициента корреляции Спирмена (r) [2]. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка лизоцима метаболитами H_2O_2 -продуцирующих лактобацилл приводила к существенному подавлению его ферментативной активности (рис. 1). Степень этого подавления находилась в прямой зависимости от концентрации H_2O_2 ($r=0,83$, $p<0,05$). Одновременно с этим мы наблюдали снижение бактерицидной активности лизоцима в отношении *L. acidophilus* и повышение в отношении *E. coli* (рис. 1). Степень изменения бактерицидной активности лизоцима зависела от концентрации H_2O_2 в супернатантах лактобацилл ($r=0,98$, $p<0,001$ для *E. coli* и $r=-0,93$, $p<0,001$ для *L. acidophilus*). Удаление H_2O_2 из супернатантов лактобацилл отменяло эффект модификации ферментативной и бактерицидной активностей лизоцима.

Обработка лизоцима метаболитами лактобацилл, продуцирующих сурфактанты, приводила к достоверному подавлению его ферментативной активности (рис. 2). Степень этого подавления находилась в прямой зависимости от выраженности ЭА супернатантов ($r=0,87$, $p<0,05$). Бактерицидная активность лизоцима при этом уменьшалась как в отношении *L. acidophilus*, так и в отношении *E. coli* (рис. 2). Изменение бактерицидности лизоцима также зависело от ЭА супернатантов ($r=-0,73$, $p<0,05$ для *E. coli* и $r=-0,92$, $p<0,001$ для *L. acidophilus*). Удаление из культуральной жидкости сурфактантов отменяло описанные эффекты. Но если в отношении *L. acidophilus* заметное снижение бактерицидной активности вызывали супернатанты с ЭА

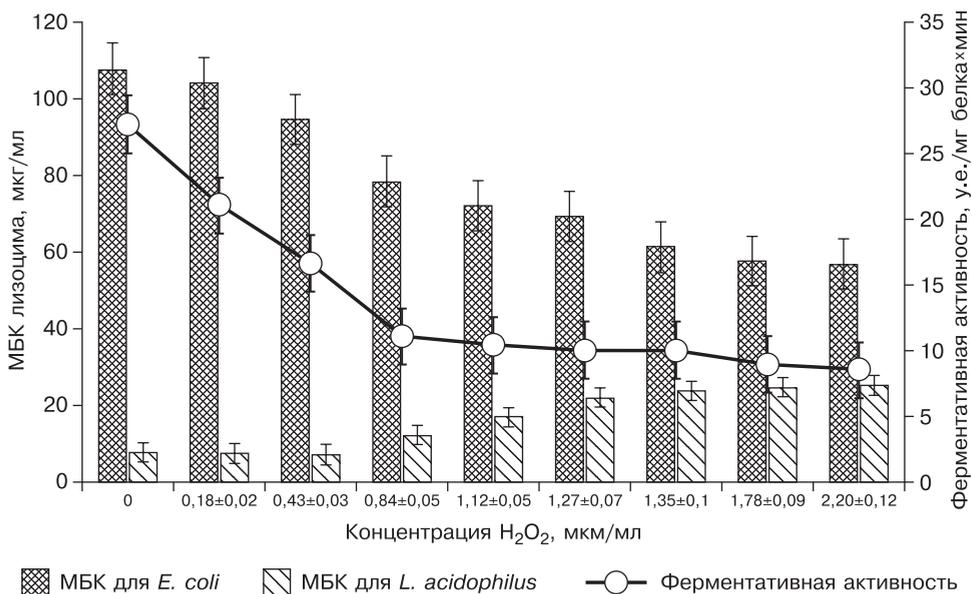


Рис. 1. Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих перексид водорода.

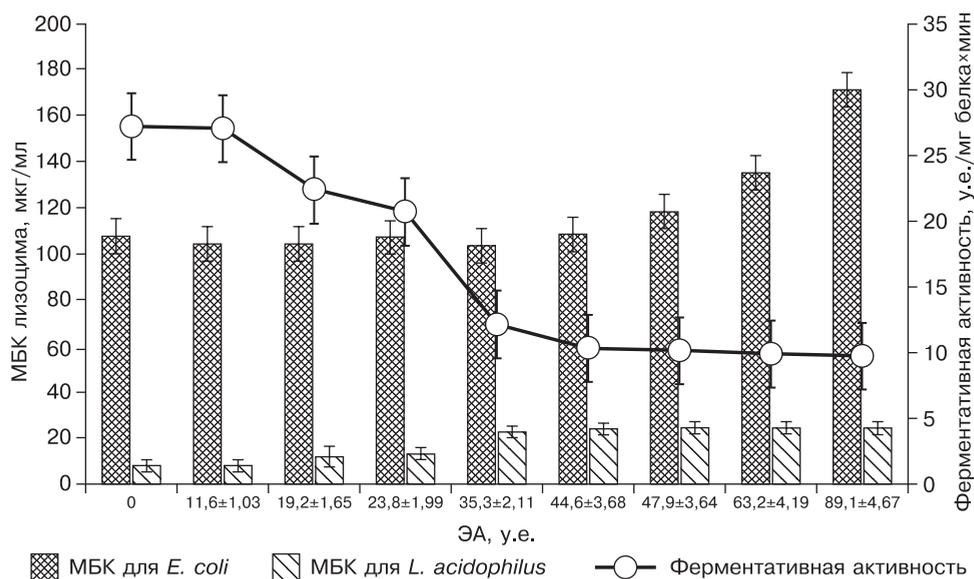


Рис. 2. Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих сурфактанты.

23,8 у.е. и выше, то в отношении *E. coli* для получения аналогичного эффекта требовался вдвое больший уровень сурфактантов.

Таким образом, результаты влияния сурфактантов и H_2O_2 на ферментативную активность лизоцима были сходны, в то время как антибактериальная активность лизоцима под влиянием этих веществ менялась по-разному.

В связи с этим, нас заинтересовала оценка совместного влияния сурфактантов и H_2O_2 на активность лизоцима (табл.). В отношении *L. acidophilus* подавление бактерицидности лизоцима наблюдалось под влиянием всех изучаемых комбинаций этих веществ. С учетом выше изложенных данных, эти результаты были вполне ожидаемы, так как и по отдельности эти вещества действовали однонаправленно. Интересно, что сочетание низких концентраций пероксида водорода и сурфактантов ($0,55 \pm 0,04$ мМ H_2O_2 и $21,6 \pm 1,8$ у.е. ЭА) снижало бактерицидность лизоцима в той же степени, что и комбинации с их высоким содержанием, а удаление любого из компонентов отменяло этот эффект, что свидетельствует о взаимном потенцировании эффектов этих метаболитов. Несмотря на то, что по отдельности H_2O_2 и сурфактанты

Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих сурфактанты и пероксид водорода.

Характеристика супернатантов		МБК лизоцима для <i>E. coli</i> , мкг/мл под влиянием:			МБК лизоцима для <i>L. acidophilus</i> , мкг/мл под влиянием:		
Концентрация H_2O_2 , мМ	ЭА, у.е.	нативных супернатантов	супернатантов, после исключения H_2O_2	супернатантов, после исключения сурфактантов	нативных супернатантов	супернатантов, после исключения H_2O_2	супернатантов, после исключения сурфактантов
0	0	107.6±16.5	107.6±16.5	107.6±16.5	7.8±0.978	7.8±0.978	7.8±0.978
0.55±0.04	21.6±1.8	68.7±14.8*	104±11.3	88±4.6*	22.1±1.3*	8.3±0.9	8.5±1.1
1.95±0.05	23.2±2.1	47.3±5.3*	107±9.8	52±3.3*	26.3±1.6*	8.1±1.1	28.3±1.8*
0.42±0.06	76±5.9	98.3±18.7	129±14.6*	97±4.9	23.3±1.9*	22.6±1.6*	8.1±1.3
1.8±0.11	73±6.1	59.3±5.5*	141±10.3*	60±4.3*	31.2±2.1*	20.9±2.1*	24.6±2.0*

Примечание. * Статистически значимые различия с контролем при $p \leq 0.05$.

разнонаправленно влияли на бактерицидность лизоцима в отношении *E. coli*, под влиянием комбинаций этих веществ бактерицидность лизоцима возрастала (табл.). При этом результаты в контроле, с исключением одного из компонентов, соответствовали ранее выявленным закономерностям. Низкие концентрации сурфактантов даже потенцировали влияние пероксида водорода на бактерицидность лизоцима в отношении *E. coli*, а действие высоких концентраций сурфактантов присутствием H_2O_2 компенсировалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

По-видимому, вагинальные лактобациллы имеют в своем арсенале несколько разных механизмов модификации лизоцима, направленных на создание благоприятных условий собственного существования.

Одним из таких механизмов является продукция пероксида водорода. Причиной изменений активности лизоцима под влиянием метаболитов H_2O_2 -продуцирующих лактобацилл, скорее всего, является окислительное повреждение, приводящее к изменению конформации молекулы лизоцима [4]. Это, с одной стороны, влечет за собой снижение его ферментативной активности и, как следствие, уменьшение бактерицидности в отношении грамположительных *L. acidophilus*. С другой стороны, это же приводит к повышению гидрофобности молекулы лизоцима, облегчению его взаимодействия с клеточной стенкой [9] и соответственно усилению бактерицидности в отношении грамотрицательных бактерий. Таким образом, продукция лактобациллами пероксида водорода обеспечивает их выживаемость в условиях давления факторов врожденного иммунитета и, повышая колонизационную резистентность биотопа для аллохтонных микроорганизмов, создает для них же конкурентное преимущество.

Следующим из таких механизмов является продукция сурфактантов. По-видимому, снижение бактерицидность лизоцима в отношении лактобацилл под влиянием сурфактантов также, как и в случае с пероксидом водорода, опосредовано ингибированием ферментативной активности лизоцима за счет изменения его конформации. Данное предположение согласуется с известным фактом снижения активности лизоцима под влиянием ПАВ [6].

Наиболее удачным в экологическом плане является способность вагинальных лактобацилл к одновременной продукции и сурфактантов, и пероксида водорода, хотя бы в малом количестве, так как при этом наблюдается усиление антибактериальной активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов и ослабление в отношении лактобацилл. Пока не ясно, связан ли наблюдаемый эффект с тем, что лизоцим, модифицируемый пероксидом водорода, по-иному, чем нативный, взаимодействует с сурфактантами или это является следствием модификации самих сурфактантов.

Основываясь на результатах нашего исследования можно заключить, что модификация лизоцима сурфактантами и пероксидом водорода является примером способности нормофлоры разнонаправленно регулировать активность факторов защиты хозяина с целью создания благоприятных условий собственного существования и препятствия интродукции чужеродных видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М., 1999.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1998.
3. Aldunate M., Srbnovski D., Hearps A.C. et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in Physiology*. 2015, 6: A164.

4. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997, 94: 2969-2974.
5. Dover S.E., Aroutcheva A.A., Faro S., Chikindas M.L. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. International J. Probiotics & Prebiotics. 2008, 3 (4): 219-230.
6. Ivanov R.A., Soboleva O.A., Smirnov S.A. et al. Effect of surfactants of different types on the bacteriolytic activity of lysozyme. Rus. J. Bioorg. Chem. 2015, 41 (3): 260-265.
7. Kaewsrichan J., Peeyananjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006, 48 (1): 75-83.
8. Nakata K., Tsuchido T., Matsumura Y. Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in Escherichia coli cells. J. Applied Microbiology. 2011, 110 (2): 568-579.
9. Nash J.A., Ballard T.N., Weaver T.E., Akinbi H.T. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. J. Immunol. 2006, 177 (1): 519-526.
10. Sgibnev A.V., Kremleva E.A. Vaginal protection by H₂O₂-producing lactobacilli. Jundishapur J. Microbiology. 2015, 8 (10): A e22913.
11. Simonian M. H., Smith J. A. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. Curr. Protoc. Mol. Biol. 2006, 76. 10.1A:10.1.1-10.1A.9.
12. Valore E.V., Park C.H., Igrati S.L., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. Am. J. Obstet. Gynecol. 2002, 187 (3): 561-568.
13. Willumsen P.A., Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. 1997, 7 (5): 415-423.
14. Wilson M. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press. 2005.
15. Yarbrough V.L., Winkle S., Herbst-Kralovetz M.M. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: A critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. Human Reproduction Update. 2015, 21 (3): 353-377.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.В.Шевченко, О.А.Медведева, А.Ю.Мухина, В.А.Королев, П.В.Калуцкий

СОСТАВ НОРМОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ПЛАЗМЫ КРОВИ, КОЛОНОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА РИОФЛОРА ИММУНО НЕО

Курский государственный медицинский университет

Цель. Изучение изменений состава микробиоценоза толстого кишечника животных и молекулярно-биохимических показателей плазмы крови и колоноцитов в условиях экспериментального лекарственного дисбиоза, возможности их коррекции с использованием пробиотика. *Материалы и методы.* Животным формировали лекарственный дисбиоз внутрибрюшинным введением гентамицина, после с целью коррекции вводили пробиотик. Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстой кишки мышей проводили бактериологическим методом. О состоянии системы перекисного окисления липидов судили по содержанию ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, системы антиоксидантной защиты — по активности ферментов (каталаза и супероксиддисмутазы). *Результаты.* В результате проведенного исследования зарегистрировано изменение состава кишечной микрофлоры, снижение ферментативной активности системы антиоксидантной защиты в плазме крови и колоноцитах, увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и колоноцитах. Отмечен корригирующий эффект пробиотика РиоФлора Иммуно Нео в отношении восстановления нормобиоценоза кишечника и молекулярно-биохимических показателей колоноцитов животных. *Заключение.* Использование пробиотика привело к восстановлению микробного равновесия в микробиоценозе кишечника, а также оказало

положительное влияние на активность супероксиддисмутазы колоноцитов, стабилизацию содержания малонового диальдегида в ткани толстого кишечника.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 27—33

Ключевые слова: мукозная микрофлора толстого кишечника, дисбиоз, антиоксидантная система, РиоФлора Иммуно Нео

A.V.Shevchenko, O.A.Medvedeva, A.Yu.Mukhina, V.A.Korolev, P.V.Kalutsky

LARGE INTESTINE NORMOBIOCENOSIS AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE OF COLONOCYTES, BLOOD PLASMA IN EXPERIMENTAL DISBIOOSIS AND USAGE OF RIOFLORA IMMUNO NEO PROBIOTIC

Kursk State Medical University, Russia

Aim. Study the changes in the composition of animals large intestine microbiocenosis and molecular-biochemical parameters of blood plasma and colonocytes in experimental gentamicin dysbiosis, possibility of correction using probiotic. *Materials and methods.* Drug dysbiosis was simulated by administration of gentamicin intraperitoneally and with correction aim injected probiotic. Quantitative and qualitative study of mucous microflora of the mice large intestine was performed by bacteriological method. The state of lipid peroxidation system was judged about by content of acylhydroperoxide and malonic dialdehyde, antioxidant protection system — by catalase and superoxide dismutase. *Results.* As a result of the study, a change in the composition of the intestinal microflora, a decrease in the enzymatic activity of antioxidant defense system in blood plasma and colonocytes, an increase in the content of lipid peroxidation products in blood plasma and colonocytes were recorded. The corrective effect of RioFlora Immuno Neo probiotic regarding the restoration of the intestine normobiocenosis and the molecular-biochemical parameters of animal colonocytes was noted. *Conclusion.* The use of the probiotic led to the restoration of microbial equilibrium in the intestinal microbiocenosis, and also had a positive effect on the superoxide dismutase activity of colonocytes, stabilization of the malonic dialdehyde content in the colon tissue.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 27—33

Key words: large intestine mucous microflora, dysbiosis, antioxidant system, RioFlora Immuno Neo

ВВЕДЕНИЕ

Нормальная микрофлора организма человека — это открытый биоценоз микроорганизмов, встречающийся у здоровых людей. Микробные популяции различных биотопов в норме выступают в роли симбионтов или сапрофитов, находясь в экологическом равновесии с организмом хозяина. Их взаимное влияние определяется механическими, биохимическими, микробиологическими, иммунологическими факторами [9].

Различные воздействия на макроорганизм экзогенных и эндогенных факторов могут приводить к количественным и/или качественным изменениям микробиоценоза толстого кишечника. Нарушение микроэкологии пищеварительного тракта, чаще обозначаемого в отечественной литературе как дисбиоз, представляет собой состояние микробиоты, при котором происходят нарушения функционирования ее составных частей и механизмов их взаимодействия [5].

Причинами изменений качественного и количественного состава кишечной микрофлоры являются воздействие на организм различных факторов экзогенного и эндогенного характера (возраста, образа жизни, сезона го-

да, характера питания, в том числе и продолжительного неконтролируемого приема антибиотиков широкого спектра действия) [3].

Известно, что одним из пусковых механизмов функционально-метаболических нарушений является декомпенсация антиоксидантной защиты организма, которая регулирует процессы перекисного окисления липидов, уровень активных форм кислорода, являющихся повреждающими факторами [4]. Поэтому состояние системы антиоксидантной защиты (АОЗ) является важным фактором, влияющим на состояние микрофлоры.

Под действием ксенобиотиков на макроорганизм происходят изменения состава микрофлоры кишечника, которая в виде биопленки препятствует проникновению патогенов. Наряду с этим повышается уровень активных форм кислорода, интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов, наблюдается развитие общего неспецифического адаптационного стресса, что влечет за собой повреждение клеточных мембран [2].

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования явилось изучение изменений состава микробиоценоза толстого кишечника животных и молекулярно-биохимических показателей плазмы крови и колоноцитов в условиях экспериментального лекарственного дисбиоза, возможности их коррекции с использованием пробиотика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводили на 150 мышах линии BALB/с массой тела 18-20 граммов. Для решения поставленных задач животные были разделены на 3 группы (по 50 мышей в каждой). Первая группа — контрольная (интактные мыши). Вторую группу составили животные, у которых моделировали лекарственный дисбиоз путем однократного ежедневного (в течение 5 дней) внутрибрюшинного введения раствора гентамицина. В третью группу входили мыши, которым по окончании введения антибиотика интрагастрально вводили пробиотик РиоФлора Иммуно Нео в течение трех недель.

По окончании сроков эксперимента изучали количественный и качественный состав микробиоценоза муцинового слоя толстого кишечника, состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в плазме крови и ткани толстого кишечника мышей: количественное определение ферментов каталазы и супероксиддисмутазы (СОД); количественное определение продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ): ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА).

Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей проводилось по методике Кафарской Л.И. и Коршунова В.М. [1, 8]. С целью определения продуктов ПОЛ и ферментов АОЗ макроорганизма использовали традиционные методики [6, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальный дисбиоз толстого кишечника, обусловленный введением гентамицина, характеризовался уменьшением численности доминантных представителей микрофлоры интактных животных (табл. 1).

Содержание бифидобактерий снизилось в 1,9 раза и составило $\lg 4,24 \pm 0,72$. Количество кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью и лактобацилл уменьшилось в 1,7 раза и составило $\lg 3,95 \pm 0,53$ и $\lg 3,73 \pm 0,77$ соответственно. При этом число эшерихий со сниженной фермента-

Таблица 1. Влияние пробиотика РиоФлора Иммуно Нео на состав мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г (M±m)		
	Группы животных		
	Контроль (интактные мыши)	Дисбиоз	Коррекция РиоФлора Иммуно Нео
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	6,77±0,78	3,95±0,53**	7,20±0,66 ^{xxx}
<i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью	4,37±0,76	7,03±0,95*	2,67±0,61 ^{xxx}
<i>Enterobacter</i> spp.	4,47±0,79	2,37±0,56*	5,92±0,74 ^{xxx}
<i>Salmonella</i> spp.	5,65±0,66	6,44±0,86	3,97±0,81 ^x
<i>Citrobacter</i> spp.	4,37±0,92	0±0 ^{***}	3,78±0,79 ^{xxx}
<i>Enterococcus</i> spp.	3,42±0,90	0±0 ^{***}	4,71±0,79 ^{xxx}
<i>Streptococcus</i> spp.	2,93±0,60	6,17±1,09*	3,48±0,49 ^x
<i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)	2,74±0,60	4,10±0,75	3,02±0,70
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	3,40±0,62 ^{***}	2,31±0,62 ^{***}
<i>Proteus</i> spp.	0	4,01±0,66 ^{***}	2,60±0,58 ^{***}
<i>Candida</i> spp.	1,26±0,32	4,94±0,74 ^{***}	1,06±0,38 ^{xxx}
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,15±0,70	3,73±0,77*	6,43±0,90 ^x
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,93±0,93	4,24±0,72**	8,20±1,22 ^{xx}

Примечание. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 по сравнению с контрольной группой; ^x p<0,05, ^{xx} p<0,01, ^{xxx} p<0,001 по сравнению с группой «дисбиоз».

тивной активностью увеличилось в 1,6 раза, lg КОЕ которых составил 7,03±0,95. Численность факультативных микроорганизмов — стрептококков возросла в 2,1 раза по отношению к контролю и составила lg 6,17±1,09. Содержание условно патогенных бактерий рода *Enterobacter* после воздействия антибиотика широкого спектра действия гентамицина уменьшилось в 1,9 раза и составило lg 2,37±0,56. В составе микробиоценоза данной экспериментальной группы не выявлено бактерий рода *Citrobacter* и *Enterococcus*, тогда как отмечалось появление отсутствующих в контроле золотистых стафилококков и бактерий рода *Proteus*, lg КОЕ которых составил 3,40±0,62 и 4,01±0,66 соответственно.

На фоне применения гентамицина в составе микробиоценоза толстого кишечника мышей количество грибов рода *Candida* увеличилось в 3,9 раза и составило lg 4,94±0,74. Что касается коагулазотрицательных стафилококков и сальмонелл, то изменения их численности были недостоверны по отношению к контролю.

При использовании пробиотика РиоФлора Иммуно Нео численность бифидо- и лактобацилл возросла и превысила значения определяемого показателя в группе «дисбиоз» в 1,9 и 1,7 раза соответственно. В биоценозе кишечника мышей, получавших данный препарат, численность эшерихий с нормальной ферментативной активностью составила lg 7,20±0,66, что в 1,8 раза превысило их количество в экспериментальной группе «дисбиоз», и при этом достигла показателя контроля. Кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью были обнаружены в количестве lg 2,67±0,61, что в 2,6 раза меньше значения определяемого показателя в группе «дисбиоз» и 1,6 в раза в контрольной группе. Увеличилось количество КОЕ бактерий рода *Enterobacter*, lg КОЕ которых составил 5,92±0,74, что было в 2,5 раза выше, чем в группе экспериментального дисбиоза, и превысило показатель в контрольной группе. *Citrobacter* spp. и *Enterococcus* spp., не выявленные при дисбиозе, были идентифицированы в количестве lg 3,78±0,79 и lg 4,71±0,79 соответственно. Количество стрептококков снизилось в 1,8 ра-

за, но не достигло значения определяемого показателя в группе интактных животных. Показатель КОЕ/г для золотистых стафилококков и бактерий рода *Proteus* снизился в 1,5 раза в сравнении с опытной группой гентамицинового дисбиоза, но не достиг контрольных значений, где данные представители отсутствовали. Количество сальмонелл после коррекции снизилось в 1,6 раза, но определяемый показатель не достиг значе-

ний группы интактных животных. Lg КОЕ грибов рода *Candida* снизился в 4,7 раза и достиг значения, близкого контролю. Изменение количества коагулазоотрицательных стафилококков было ниже уровня достоверности.

При изучении активности ферментов системы антиоксидантной защиты макроорганизма были получены следующие результаты (табл. 2).

В контрольной группе животных активность каталазы в плазме крови составила $12,86 \pm 0,87$, в ткани кишечника — $14,11 \pm 0,88$, активность СОД — $14,24 \pm 1,03$ и $14,23 \pm 1,03$ соответственно.

Полученные данные показывают, что у мышей при экспериментальном дисбиозе отмечается снижение активности изученных ферментов: каталазы и СОД в плазме крови в 1,3 раза и 1,2 раза соответственно по сравнению с контрольной группой. В ткани кишечника обнаружено достоверное снижение данных показателей в 1,4 и 1,8 раза соответственно.

Применение пробиотика РиоФлора Иммуно Нео с целью коррекции гентамицинового дисбиоза привело к достоверному увеличению содержания СОД в ткани кишечника мышей в 1,6 раза, однако данный показатель не достиг значений определяемого показателя в контрольной группе. Изменения содержания каталазы были недостоверны.

Анализируя данные, полученные при изучении продуктов перекисного окисления липидов (табл. 3), мы отметили, что содержание МДА в плазме крови составило $2,46 \pm 0,95$, в ткани кишечника — $3,57 \pm 0,57$, содержание АГП — $0,81 \pm 0,09$ и $0,31 \pm 0,03$ соответственно.

После введения гентамицина у животных проис-

Таблица 2. Активность ферментов АОЗ в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции пробиотиками

Группы животных	Активность каталазы (M±m)		Активность супероксиддисмутазы (M±m)	
	Плазма, мкат/мл	Гомогенат ткани кишечника, мкат/г белка ткани	Плазма, у.е.	Гомогенат ткани кишечника, у.е
Контроль (интактные мыши)	$12,86 \pm 0,87$	$14,11 \pm 0,88$	$14,24 \pm 1,03$	$14,23 \pm 1,03$
Дисбиоз	$10,20 \pm 0,78^*$	$10,12 \pm 1,62^*$	$11,50 \pm 0,77^*$	$7,79 \pm 1,22^{***}$
Коррекция РиоФлора Иммуно Нео	$12,24 \pm 0,95$	$12,15 \pm 0,64$	$12,33 \pm 1,06$	$12,63 \pm 1,01^{xx}$

Примечание. * p<0,05, *** p<0,001 по сравнению с контрольной группой; xx p<0,01 по сравнению с группой «дисбиоз».

Таблица 3. Содержание продуктов ПОЛ в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции пробиотиками

Группы животных	Содержание малонового диальдегида, мкмоль/г ткани (M±m)		Содержание ацилгидроперексидей, у.е (M±m)	
	Плазма, мкат/мл	Гомогенат ткани кишечника, мкат/г белка ткани	Плазма, у.е.	Гомогенат ткани кишечника, у.е
Контроль (интактные мыши)	$2,46 \pm 0,95$	$3,57 \pm 0,57$	$0,81 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,03$
Дисбиоз	$3,95 \pm 0,41^{**}$	$6,82 \pm 0,72^{***}$	$1,13 \pm 0,07^{**}$	$0,70 \pm 0,08^{***}$
Коррекция РиоФлора Иммуно Нео	$3,68 \pm 0,26^{**}$	$3,26 \pm 0,20^{xxx}$	$0,95 \pm 0,19$	$0,52 \pm 0,06^{**}$

Примечание. ** p<0,01, *** p<0,001 по сравнению с контрольной группой; xxx p<0,001 по сравнению с группой «дисбиоз».

ходило увеличение концентрации продуктов ПОЛ в плазме крови и ткани кишечника. При этом содержание МДА увеличивалось в 1,6 раза в плазме крови и в 1,9 раза в колоноцитах; АГП — в 1,4 раза в плазме крови и 2,3 раза в колоноцитах относительно контрольных величин.

При изучении влияния пробиотика РиоФлора Иммуно Нео на содержание продуктов ПОЛ было выявлено снижение количества МДА в колоноцитах в 2,1 раза при сравнении со значениями у мышей в группе «дисбиоз». Отмечено, что полученные значения превосходят соответствующие показатели в контрольной группе.

Таким образом, воздействие антибиотика широкого спектра действия (гентамицина) привело к существенным изменениям в составе кишечного микробиоценоза, так как были зарегистрированы качественные и количественные изменения состава микрофлоры. А именно, отмечено снижение количества бифидобактерий, лактобацилл, микроорганизмов рода *Enterobacter*. Представители родов *Citrobacter* и *Enterococcus* не идентифицировались. Одновременно со снижением количества кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью возросло количество эшерихий со сниженной ферментативной активностью, стрептококков, грибов рода *Candida*. При этом в составе микробиоценоза толстого кишечника обнаруживались золотистые стафилококки и протей.

Гентамициновый дисбиоз толстого кишечника сопровождался снижением активности антиоксидантных ферментов в плазме крови и ткани кишечника (каталаза, СОД), указывающих на напряженность их антирадикальной защиты. Динамика данных показателей в ткани кишечника может быть результатом воздействия качественных и количественных изменений состава кишечной микрофлоры на метаболизм колоноцитов, которые и являются непосредственно контактирующей зоной с микроорганизмами. Важно отметить тот факт, что микроорганизмы способны выделять в окружающую среду жирные кислоты, свободные радикалы, пероксиды, в результате чего происходит накопление продуктов их метаболизма, обладающих токсическим действием на различные биологические системы макроорганизма [10].

Увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в колоноцитах свидетельствует о степени риска нарушения целостности клеточных мембран непосредственно в зоне обитания микроорганизмов и обусловлено как действием самого антибиотика, так и увеличением численности стрептококков, золотистых стафилококков, протей, грибов рода *Candida* в результате развития дисбиоза.

Достоверно высокое содержание МДА и АГП может указывать на возможное повреждение клеточных мембран, которое сочетается со снижением активности каталазы и СОД относительно контрольных значений.

Использование пробиотика РиоФлора Иммуно Нео привело к восстановлению микробного равновесия (бифидобактерий, лактобацилл, кишечных палочек с нормальной и сниженной ферментативной активностью, сальмонелл, стрептококков, бактерий родов *Enterococcus*, *Enterobacter* и *Citrobacter*, грибов рода *Candida*) в толстом кишечнике экспериментальных животных.

При этом использование пробиотика оказало положительное влияние на активность фермента СОД колоноцитов, стабилизацию содержания МДА в ткани толстого кишечника, что может быть результатом восстановления микробного равновесия в микробиоценозе кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов. Вестн. РАМН. 2006, 2: 6-10.
2. Зоров Д.Б. и др. Друзья или враги. Активные формы кислорода и азота. Биохимия. 2005, 70 (2): 265-272.
3. Завгородняя Е.Ф. Особенности микробиологической характеристики дисбиозов кишечника в современных условиях. Дальневост. журн. инфекц. патологии. 2008, 12: 161-162.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты М.: Наука/Интерпериодика, 2001.
5. Костюкевич О.И. Современное представление о микробиоценозе кишечника. Дисбактериоз и его коррекция. РМЖ. 2007, 28: 2176-2182.
6. Королюк М.А. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988, 1: 16-19.
7. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени. Лаб. дело. 1988, 11: 48-50.
8. Несвижский Ю.В. и др. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом Журн. микробиол. 2007, 3: 57-60.
9. Несвижский Ю.В. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и патологии. Вестн. РАМН. 2003, 1: 49-53.
10. Шишкина Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при действии повреждающих факторов. Дис. д-ра хим. наук. М., 2003.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.Г.Семин, Л.Н.Синяшина, А.Ю.Медкова, Г.И.Каратаев

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA PERTUSSIS* ГЕНОТИПА PtxP3

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Цель. Конструирование рекомбинантных бактерий *B. pertussis* генотипа ptxP3 и характеристика их генетической и биологической стабильности. *Материалы и методы.* В качестве реципиента при конструировании аттенуированных бактерий генотипа ptxP3 использованы вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 генотипа ptxP1, применяемые для производства вакцины АКДС в Российской Федерации. Мутантные бактерии *B. pertussis* 475 получены в результате аллельного обмена между нативной копией целевой последовательности в составе хромосомы и ее мутантной копией в рекомбинантной суицидной плазмиде, переданной в реципиентную бактерию с помощью конъюгации. Конструирование рекомбинантных плазмид осуществлено стандартными методами генетической инженерии. Структура модифицированных участков хромосомы аттенуированных бактерий определена с помощью ПЦР и секвенирования фрагментов амплификации. Стабильность структуры и свойств аттенуированных бактерий определена после 15 пассажей бактерий на питательной среде и 5 — в организме мышей. *Результаты.* Сконструированы изогенные аттенуированные бактерии PtxP1 *B. pertussis* 4M и PtxP3 *B. pertussis* 4MKS, продуцирующие коклюшный токсин (КТ), лишенный ферментативной токсической активности, и не продуцирующие дермонекротический токсин. Промоторная область оперона ptx аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS содержит мутацию, характерную для «нового» генотипа циркулирующих в настоящее время вирулентных бактерий *B. pertussis* и увеличивающую продукцию КТ. Структура модифицированных фрагментов ДНК и свойства аттенуированных бактерий

не изменяются при хранении и пассажах на питательной среде и в организме мышей. *Заключение.* Сконструированы рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4MKS «нового» генотипа ptx*P3 и показана перспективность направленной генноинженерной модификации изогенных бактерий *B. pertussis* для создания инновационных препаратов для профилактики коклюша.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 33—41

Ключевые слова: коклюш, рекомбинантные аттенуированные бактерии *B. pertussis*, конструирование, генотип, вакцина

E.G.Semin, L.N.Sinyashina, A.Yu.Medkova, G.I.Karataev

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT ATTENUATED *BORDETELLA PERTUSSIS* BACTERIA OF PTXP3 GENOTYPE

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Aim. The construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP3 genotype and its genetic and biological stability characteristics. *Materials and methods.* During construction of recombinant attenuated bacteria of ptxP3 genotype virulent *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP1 genotype were used as a recipient. PtxP1 genotype bacteria are used for whole cell pertussis (wP) vaccine production in Russia. Mutant bacteria *B. pertussis* 475 were received by crossing-over between chromosome comprising native copy of target sequence and its mutant copy in recombinant suicide plasmid transferred in recipient bacteria by conjugation. Genetically engineered construction of recombinant plasmids was conducted. The structure of modified chromosome locus of attenuated bacteria was determined by PCR and amplification fragments sequence. The stability of structure and characteristics of attenuated bacteria was defined after 15 passages of strains on culture medium and 5 passages in mice. *Results.* Isogenic attenuated ptxP1 *B. pertussis* 4M and ptxP3 *B. pertussis* 4MKS were constructed. These bacteria produce non-toxic pertussis toxin (PT) and do not produce dermonecrotic toxin (DNT). The promoter region of ptx operon contains mutation, typical for «new» genotype of circulating virulent bacteria and increasing PT production. The structure of modified DNA fragments and characteristics of attenuated bacteria did not change while storing and after passages on culture medium and in mice. *Conclusion.* Recombinant attenuated bacteria *B. pertussis* 4MKS of «new» ptxP3 genotype are constructed. Application perspectiveness of genetically engineered modification of isogenic *B. pertussis* bacteria for pertussis vaccines development is shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 33—41

Key words: pertussis, recombinant attenuated bacteria *B. pertussis*, construction, genotype, vaccines

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш — высококонтагиозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*, передающееся воздушно-капельным путем. Специфическая профилактика коклюша, проводимая с 50-х годов прошлого века цельноклеточными коклюшными вакцинами (ЦКВ), позволила снизить заболеваемость до единичных случаев на 100 тыс. населения [3]. Однако наряду с положительным эффектом наблюдали нежелательные побочные реакции и поствакцинальные осложнения, которые в 90-х годах инициировали отмену в ряде стран вакцинации против коклюша и, как следствие, резкое увеличение тяжелых форм заболевания и смертности детей [12], что послужило основанием для разработки бесклеточных коклюшных вакцин

(БКВ), признанных ВОЗ менее реактогенными [11,13]. В настоящее время для массовой иммунизации применяют оба типа коклюшных вакцин в составе комбинированных препаратов. Тем не менее, показатели заболеваемости коклюшем растут как во всем мире, так и в России, особенно среди детей в возрасте до 1 года [1, 2, 13], наиболее значимо в тех странах, где для первичной иммунизации применяют только БКВ [10]. Одной из причин роста заболеваемости коклюшем является краткосрочная эффективность современных вакцин [7].

В развитии инфекционного процесса бактерии *V.pertussis* реализуют множественные факторы патогенности. Важнейшим фактором вирулентности признан коклюшный токсин. В настоящее время в геноме циркулирующих бактерий *V.pertussis* отмечают существенные изменения по сравнению со штаммами довакцинального периода. Накопление в популяции вирулентных бактерий *V.pertussis* с так называемыми «новыми» генотипами позволяет возбудителю «скользнуть» от коллективного иммунитета, формируемого современными коклюшными вакцинами. Особенно быстрое формирование «новых» генотипов бактерий *V.pertussis* наблюдается с начала периода применения бесклеточных коклюшных вакцин (БКВ). К «новым» генотипам относятся бактерии генотипа *ptxP3* с мутацией в промоторной области оперона *ptx*, увеличивающие продукцию КТ и вирулентность бактерий. Частота встречаемости «новых» генотипов возбудителя коклюша достигает 30–70% от общего числа циркулирующих бактерий *V. pertussis* [10]. Изменение иммунобиологических свойств возбудителя коклюша отражается и на эффективности ЦКВ [6].

Изучение механизма патогенеза коклюша и изменчивости бактерий привело научное сообщество к пониманию необходимости создания нового поколения вакцин и замены «старых» вакцинных штаммов на «новые». Разрабатываемые в течение последних десятилетий методы генетической модификации бактерий *V. pertussis* позволяют конструировать аттенуированные рекомбинантные бактерии и разрабатывать эффективные препараты для профилактики коклюша [8, 9]. В предыдущей работе нами было проведено конструирование аттенуированных бактерий *V. pertussis* на основе реципиентов, несущих генотип *ptx P1* [8]. Аттенуированные бактерии *V. pertussis* KS содержат две мутации в опероне *ptx*, нокаутную мутацию гена *dnt*, продуцируют нетоксичную форму коклюшного токсина (КТ*) и не синтезируют дермонекротический токсин. Показана их высокая протективная активность и низкая токсичность. Можно ожидать, что увеличение уровня продукции КТ*, характерное для «нового» генотипа *ptxP3*, способно повысить защитную активность аттенуированных бактерий *V. pertussis*.

Целью настоящей работы было конструирование рекомбинантных бактерий *V. pertussis* генотипа *ptxP3* и характеристика их генетической и биологической стабильности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и плазмиды, использованные и сконструированные в работе, представлены в табл. 1 и 2.

Клонирование, рестрикционный анализ, лигирование, электрофорез ДНК, генетические манипуляции (трансформацию клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК или лигированной смесью) проводили в соответствии со стандартными рекомендациями [4].

Выделение ДНК плазмид, хромосомы и продуктов ПЦР из геля проводили с помощью систем Wizard Plus SV Mini Preps DNA purification system

Таблица 1. Плазмиды, использованные и сконструированные в настоящей работе

Название	Маркеры	Структура	Источник
pJQ	Gm ^R	вектор (γ -ori-R6K и mob-сайт oriTRP4), чувствительность к Sm	НИЦЭМ
pKS2	Gm ^R	pJQ::ptx*::kan	Н.Р.
pKS7	Sm ^R	pJQ::dnt::cat (в Tth111 I)	Н.Р.
pGemT	Ap ^R	Вектор для клонирования	Promega
pKS9	Ap ^R	pGemT:: ptxP3 (ампликон)	Н.Р.
pKS10	Gm ^R	pJQ::ptxP3(EcoRI ф-т pKS9)	Н.Р.

Таблица 2. Штаммы бактерий *B. pertussis* и *Escherichia coli*, использованные и сконструированные в настоящей работе

Штамм	Генотип	Фенотип	Источник
<i>B. pertussis</i> 475	Rif ^S Cm ^S Km ^S Sm ^S Nal ^S	1.2.3. Bvg+	НИЦЭМ
<i>B. pertussis</i> 476	Sm ^R Nal ^R	1.2.3. Bvg+	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4	Sm ^R Nal ^R Km ^R ptx*	1.2.3. B. p 476 ptx*	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4M	Cm ^R Sm ^R Nal ^R Km ^R ptx*dnt::cat	1.2.3.7. B. p 4 Dnt	Н.Р.
<i>B. pertussis</i> 4MKS	Cm ^R Sm ^R Nal ^R Km ^S ptx*dnt PtxP3	1.2.3.7. B. p 4M PtxP3	Н.Р.
<i>E. coli</i> Sm 10	Km ^R recA, RP4:2-Tc::Mu aph:: Tn7 pir		НИЦЭМ

Примечание. Н.Р. сконструированы в настоящей работе; НИЦЭМ коллекция НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; ptx * мутантный оперон ptx.

(Promega, США), Wizard Plus Mini Preps DNA purification system (Promega, США) и Wizard SV Geland PCR Clean-up System (Promega, США). ПЦР проводили на приборе Терцик (Россия) с использованием специфических праймеров, синтезированных ЗАО «СИНТОЛ».

Мышей усыпляли эфиром, легкие извлекали и гомогенизировали в 0,85 % растворе хлорида натрия pH 7.2-7.4, инкубировали 15 мин при температуре 36 °C и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5-10 мин. По 0,1 мл супернатанта высевали на три чашки Петри с селективной средой и использовали для выделения ДНК. Супернатанты гомогенатов легких обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США.

Автоматическое секвенирование проводили на 373A Automatic Sequencer (Applied Biosystems, USA) с использованием реактивов Dye Deoing Terminator AB Isequencing Kit с Taq-полимеразой FS (Perkin Elmer, USA). Для реакции использовали плазмиды или продукты амплификации ДНК.

Фенотипические характеристики аттенуированных бактерий *B. pertussis* изучали на отдельных колониях, выросших на среде КУА с добавлением селективных антибиотиков и 15% дефибрированной крови барана для регистрации гемолитической активности. Для серотипирования использовали сухие диагностические коклюшные сыворотки для реакции агглютинации (РА) к главным агглютиногенам бактерий *B. pertussis* — 1, 2, 3, в соответствии с рекомендациями МУК 4.2.2317-080 и производителя [5].

Изучение структуры модифицированных фрагментов генома аттенуированных бактерий *B. pertussis* проводили с помощью генетических (методом реплик на селективные среды) и молекулярно-биологических методов (анализ структуры и последовательности продуктов ПЦР ДНК хромосомы *B. pertussis*, содержащих мутантные гены). Для проведения ПЦР были использованы праймеры. специфичные для последовательностей генов ptx, kan, cat и dnt.

Специфическую активность КТ — лейкоцитозстимулирующую (ЛСА) и гистаминсенсibiliзирующую (ГСА) активность определяли в соответствии со стандартными методиками при внутрибрюшинном и интраназальном введении лабораторным мышам. Активность дермонекротического токсина аттенуированных бактерий *V. pertussis* определяли при внутрикожном введении кроликам и морским свинкам [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами было описано конструирование мутантного оперона *ptx*, гена *dnt*, генома аттенуированных бактерий на основе реципиентов *V. pertussis* 135 и 232 и их иммунобиологические характеристики [8].

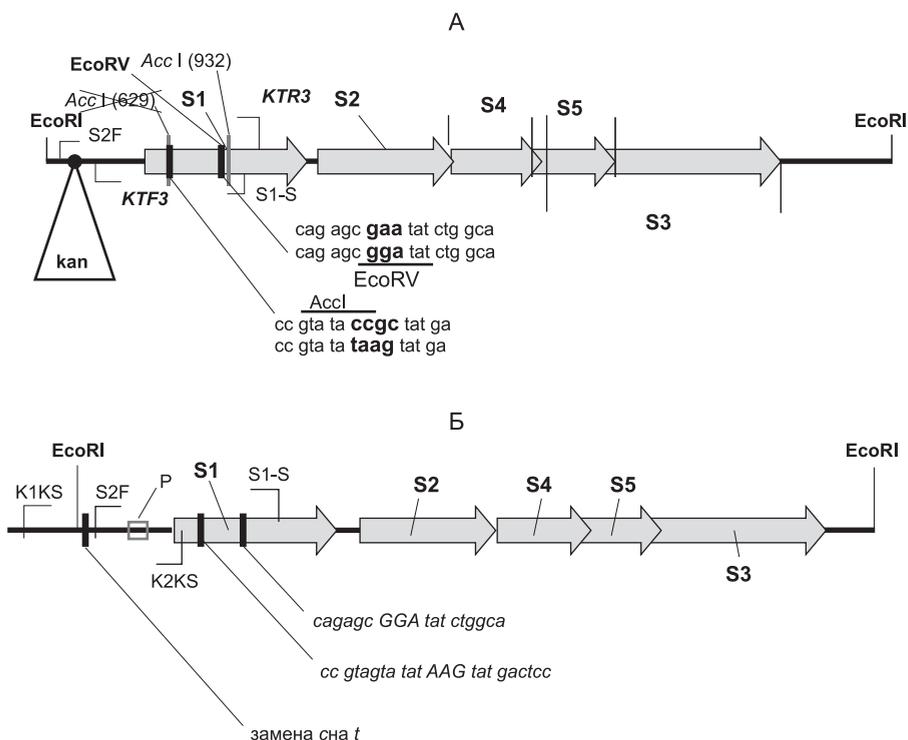
В настоящей работе в качестве реципиента использованы бактерии *V. pertussis* 475 генотипа *ptxP1*, входящие в состав коклюшного компонента вакцины АКДС. Последовательность оперона *ptx* содержала описанные ранее мутации аминокислот Arg9 и Glu129, а ген *dnt* — нокаутную инсерцию последовательности *cat* [8]. Для аллельного обмена использовали суицидные плазмиды, сконструированные на основе вектора *pJQ*. Характеристики рекомбинантных плазмид *pKS2* и *pKS7*, содержащих мутантный, маркированный геном *kan*, оперон *ptx*, и последовательность гена *dnt* с инсерцией гена *cat* в сайте *Tth111*, представлены в табл. 1.

Рекомбинантные бактерии *Ptx* P1 V. pertussis* 4M, содержащие мутацию в опероне *ptx*, сконструированы в результате скрещивания *Str^RNal^R V. pertussis* 475 x *E. coli* Sm10/*pSK2*. Селекцию *Nal^RKm^R* транскоъюгантов проводили на селективной среде КУА, содержащей налидиксовую кислоту и канамицин. Доминантность признака *Str^S* в составе плазмиды *pJQ* позволяла осуществить отбор транскоъюгантов, содержащих в хромосоме *V. pertussis* только копию целевой мутантной последовательности, и исключить транскоъюганты, имеющие коинтегра́т хромосомы с плазмидой. Искомые транскоъюганты должны иметь фенотип *Str^RGm^SKm^RNal^R*. Поэтому после расчистки *Nal^RKm^R* транскоъюганты высевали на чашки КУА со стрептомицином или стрептомицином и канамицином. Выросшие колонии двукратно расчищали на чашках со стрептомицином + канамицин и проверяли по маркерам устойчивости к *Str*, *Nal*, *Km* и *Gm*. Клоны *Str^RNal^RKm^RGm^S* использовали для дальнейшего анализа. Генетический анализ транскоъюгантов показал, что все клоны *Str^RNal^RKm^R*, выросшие на среде с добавлением стрептомицина, чувствительны к *Gm*. ПЦР, рестрикция и секвенирование фрагментов амплификации нескольких *Str^RNal^RKm^RGm^S* транскоъюгантов показали, что они являются искомыми рекомбинантными бактериями *V. pertussis*, в хромосоме которых на месте дикого аллеля *ptx* находится его мутантная копия, маркированная геном устойчивости к канамицину. Один из охарактеризованных транскоъюгантов назван *V. pertussis* 4.

Аналогичным образом были отобраны и проанализированы *Str^RNal^RKm^RGm^S Cm^R* транскоъюганты, полученные в скрещивании Sm10/*pKS7* x *Str^RNal^RKm^R V. pertussis* 4. Для дальнейшего конструирования использован охарактеризованный *Dnt-Ptx*P1 Str^RNal^RKm^RCm^R* рекомбинант, названный *V. pertussis* 4M.

Рекомбинантные бактерии *Dnt-Ptx*P3 V. pertussis* сконструированы в результате замены фрагмента, содержащего последовательность *ptxP1* в геноме бактерий *V. pertussis* 4M, на последовательность *ptxP3* в составе плазмиды *pKS10*. Источником последовательности *ptxP3* являлась хромосома *V. pertussis* «нового», синтезированная в результате амплификации ДНК *V. pertussis* 55-12, выделенного

в России, описанного и предоставленного нам Борисовой О.Ю. Для амплификации целевого фрагмента, содержащего мутацию и сайт узнавания *StuI*, использованы праймеры K1KS и K2KS. Амплифицированный фрагмент клонирован в векторе pGemT (плазмида pKS9) (Promega, USA) и переклонирован в вектор pJQ. Рекомбинантная плазмида получила название pKS10. Плазмиду pKS10 трансформировали в бактерии *E. coli* SM10-донора в скрещивании с аттенуированными бактериями *B. pertussis* 4M. Трансконъюганты отбирали на селективной среде, содержащей Cm, Str и Gm. Поскольку целевой фрагмент содержит сайт *StuI* хромосомы *B. pertussis* 4M с интегрированной последовательностью гена *kan*, то событие аллельного обмена, приводящее к искомой замене последовательности регуляторной области *ptxP1* на *ptxP3*, должно сопровождаться потерей маркера устойчивости к канамицину. В связи с этим, после расчистки трансконъюгантов на селективной среде бактерии *B. pertussis* высевали до отдельных колоний на среду КУА с добавлением Cm и Str. Отдельные колонии методом реплик переносили на селективные среды, содержащие один из пяти антибиотиков: Cm, Str, Gm, Km или Nal. Трансконъюганты с фенотипом $Km^S Cm^R Nal^R Str^R Gm^S$ проверяли на наличие последовательности гена *kan*, соответствие структуры регуляторной области оперона *ptx** генотипу *ptxP3* и инсерции в гене *dnt*. Анализ структуры модифицированных участков проводили с помощью ПЦР и секвенирования. На рис. показано расположение мутации на хромосоме бактерий «нового» генотипа *ptxP3*, названных *B. pertussis* 4MKS. Амплификация ДНК, рестрикция и секвенирование подтвердили идентичность модифицированных участков



Структура фрагментов хромосомы *Bordetella pertussis* 4M (А) и *Bordetella pertussis* 4MKS (Б).

Ломаные линии показывают положение праймеров, использованных для определения структуры модифицированных фрагментов генома *B. pertussis*; квадратный бокс с надписью P отображает положение промотора оперона *ptx*; S1-S5 — положение соответствующих генов КТ в опероне *ptx*; заглавные и прописные буквы курсива обозначают описанные в тексте последовательности; *EcoRI* — сайты рестрикции на карте фрагментов хромосомы *Bordetella pertussis*.

хромосом *B. pertussis* 4MKS и *B. pertussis* 4M, наличие замен аминокислот Arg9 (CGC) и Glu129(AAG) и замену нуклеотида *c* на *t* в положении — 65, соответствующую «новому» генотипу ptxP3 в хромосоме *B. pertussis* 4MKS (рис.).

После 15 пересевов на среде КУА с добавлением дефибрированной крови и пяти пассажей в легких мышей аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS изучали стабильность морфологических и фенотипических характеристик микробных

клеток и колоний, гемолитическую активность, состав видоспецифических агглютиногенов, маркеры устойчивости к антибиотикам, структуру модифицированных участков хромосомы. Наблюдалось формирование типичных для *B. pertussis* округлых блестящих колоний, размером около 1 мм, с четко очерченными краями, гладкой поверхностью и зоной гемолиза диаметром 1-2 мм. При микроскопии грамотрицательные коккобациллы располагались отдельно или парами. Все изученные клоны сохранили серовар 1.2.3. При определении маркеров S_m^R и K_m^S в составе модифицированных участков генома аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS методом реплик не было выявлено ни одной колонии, потерявшей устойчивость к хлорамфениколу (проверено около 500 КОЕ).

Изучение токсической активности КТ*, экспрессируемого рекомбинантными бактериями PtxP3 *B. pertussis* 4MKS, проводили в тестах ЛСА и ГСА после интраназального (i/n) и интраперитонеального (i/p) введения мышам Balb/c. Интраназально вводили 10^{10} м.к. (200 МЕ) в 25 мкл 0,85 % р-р NaCl; интраперитонеально — 10^{10} м.к. в 0,5 мл 0,85 % р-р NaCl (табл. 3 и 4). В соответствии с МУК (4.2.2317-080) ЛСА рекомбинантных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS определяли параллельно с отраслевым стандартным образ-

Таблица 3. Лейкоцитостимулирующая активность аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS ptxP3 при интраназальном и интраперитонеальном введении мышам линии Balb/c

Бактерии	Доза	No ¹⁾	Способ введения	Nл ²⁾ через 72 ч
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10 МЕ	10	i/n ³⁾	9700± 900
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10 МЕ	10	i/p ⁴⁾	12700± 1000
ОСО-3	10 МЕ			17000+ 1050
0,85 % р-р NaCl	0,5 мл	5	i/p	7990 ±1151
0,85 % р-р NaCl	25 мкл	5	i/ n	6840 ±737

Примечание. 1) количество мышей в эксперименте; 2) количество лейкоцитов в мкл крови; 3) интраназальное введение; 4) интраперитонеальное введение.

Таблица 4. Гистаминсенсбилизирующая активность аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4MKS при интраназальном и интраперитонеальном введении мышам линии C57 BL/6

Бактерии	Доза (м.к. $\times 10^9$)	No ¹⁾	Способ введения	Гибель мышей		N _v ²⁾	N _n ³⁾	% гибели мышей	ГСД ₅₀ (м.к. $\times 10^9$)
				2 ч	24 ч				
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10,0	10	i/n	0	0	10	0	0	>10,0
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
<i>B. pertussis</i> 4MKS	10,0	10	i/p	0	0	9	1	10	> 10,0
	2,0	10		0	0	10	0	0	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
ОСО-5 42-28-87-02П	10,0	10	i/p	8	0	2	8	80	2,0
	2,0	10		6	0	4	6	60	
	0,4	10		0	0	10	0	0	
Контроль	0,85% NaCl	10	i/p	0	0	0	0	0	-
Контроль	0,85% NaCl	10	i/n	0	0	0	0	0	-

Примечание. 1) количество мышей в опыте; 2) количество выживших мышей; 3) количество погибших мышей.

цом — ОСО-3 (42-28-89) и ГСА сравнительно с ОСО-5 (42-28-87-02П). Расчет ГСД₅₀ (ГСА) представлен только для ОСО-5, поскольку после введения разрешающей дозы гистамина не было гибели мышей, иммунизированных бактериями *B. pertussis* 4MKS. ГСА препарата ОСО-5 имела дозозависимый характер, что позволило считать эксперимент корректным. Дермонекротическую активность аттенуированных бактерий PtxP3 *B. pertussis* 4MKS изучали в сравнении с изогенными вирулентными бактериями *B. pertussis* 475. При внутрикожном введении кроликам и морским свинкам 0,2 мл суспензии, содержащей от 10 до 50 МОЕ *B. pertussis* 4MKS, активности дермонекротического токсина выявлено не было, в то время как при введении вирулентных бактерий *B. pertussis* 475 в дозе 2×10^8 м.к. наблюдали образование выраженного некроза, достигающего $20 \pm 0,5$ мм в диаметре. Аналогичные результаты получены при изучении токсической активности бактерий PtxP1 *B. pertussis* 4M.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования последнего десятилетия в разных странах, в том числе и в России, показали, что в настоящее время на фоне массовой вакцинации циркулирующие штаммы бактерии *B. pertussis* содержат измененные последовательности *ptx*, *fga*, *prn*, отличающиеся от последовательностей в штаммах *B. pertussis* довакцинального периода. Высказываются предположения, что рост заболеваемости коклюшем непосредственно связан с циркуляцией бактерий «новых» генотипов [2, 10]. Для производства современных коклюшных вакцин рассматривается возможность замены вакцинных штаммов на «новые», несущие современные генотипы. Большинство выявленных мутаций в последовательности *ptx*, кодирующей КТ, расположены в области, ответственной за формирование структур протективных эпитопов. На данный момент нет достоверных данных, подтверждающих практическую целесообразность использования бактерий с «новыми» генотипами, касающимися структуры протективных антигенов для производства вакцин, однако они, вероятно, появятся, так как исследования в этом направлении проводятся в ряде лабораторий мира. Исключение составляет генотип *ptxP3*, доминирующий в последнее десятилетие. Бактерии, несущие генотип *ptxP3*, содержат точечные мутации в регуляторной области промотора оперона *ptx*, ответственной за связывание белка BvgA, усиливающего экспрессию оперона и продукцию КТ, и не затрагивающие его структуру. Показано, что бактерии *B. pertussis* генотипа *ptxP3* продуцируют увеличенное количество коклюшного токсина и более вирулентны в экспериментах на животных. Сконструированные нами ранее аттенуированные бактерии *B. pertussis* имеют довакцинный генотип *ptxP1* [8].

Для увеличения продукции КТ* как основного протективного антигена возбудителя коклюша и создания модели для изучения влияния этой мутации на протективность коклюшной вакцины нами были сконструированы рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с «новым» генотипом *ptxP3* на основе изогенных аттенуированных бактерий *B. pertussis* 4M генотипа *ptxP1*.

Сопоставление рекомбинантов PtxP3 *B. pertussis* 4MKS и PtxP1 *B. pertussis* 4M показало полное отсутствие у них токсической активности, независимо от уровня продукции КТ*.

Стабильность структуры модифицированных участков оперона *ptx* и гена *dnt* после хранения бактерий, пассажей на питательной среде и в организме

животных подтверждена амплификацией соответствующих фрагментов хромосомы, их рестрикционным картированием, секвенированием и не зависела от генотипа бактерий. На следующем этапе будет проведено сравнительное изучение защитной активности изогенных аттенуированных бактерий с генотипами ptx* P1 и ptx* P3.

Таким образом, сконструированные нами аттенуированные рекомбинантные бактерии *B. pertussis* 4MKS с «новым» ptxP3 генотипом регуляторной области оперона ptx сохранили кодирующую последовательность ptx* бактерий Ptx*P1 *B. pertussis* 4M и нокаутную мутацию в гене *dnt*. Генетическая структура и биологические свойства бактерий Ptx*P3 *B. pertussis* 4MKS стабильны при пересевах на селективных питательных средах и пассажах в организме лабораторных животных. Аттенуированные бактерии Ptx*P3 *B. pertussis* 4MKS могут быть более эффективными при создании новых рекомбинантных препаратов для профилактики коклюша, в частности, живой коклюшной вакцины (Патент РФ № 2455024⁽¹³⁾ С1. 10.07.2012).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева И.А., Чупринина Р.П., Борисова В.Н. Сравнительный анализ безопасности и эффективности отечественных и зарубежных комплексных вакцин, содержащих цельноклеточную коклюшную вакцину. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012, 3(64): 48-54.
2. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Попова О.П. и др. Структура популяции штаммов возбудителя коклюша на территории России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 4(86): 22-27.
3. Захарова М.С. Влияние вакцинации на эпидемиологию коклюша в СССР. В кн.: *Эпидемиология и иммунопрофилактика коклюша в СССР, ВНР, НРБ и ЧССР*. М., 1985.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
5. МУК 4.2.2317-08. Методические указания. Издание официальное. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. М., 2009.
6. Перельгина О.В., Алексеева И.А. Безопасность комбинированных вакцин с цельноклеточным коклюшным компонентом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016, 6 (91): С. 62-69.
7. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В. и др. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции. *Журн. инфекция и иммунитет*. 2017, 7(2): 162-170.
8. Сняшина Л.Н., Сняшина Л.С., Семин Е.Г. и др. Конструирование генетически аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis*, утративших активность дермонекротического токсина и продуцирующих измененную нетоксичную форму коклюшного токсина. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010, 3: 31-36.
9. Mielcarek N., Debrie A.S., Raze D. et al. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2006, 2 (7): 65-69.
10. Mooi F.R. *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* 2010, 10 (1): 36-49.
11. Sato Y., Sato H. Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*. 1999, 27: 61-67.
12. WHO. Expert committee on biological standardization. Recommendation to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Acellular Pertussis Vaccines. Geneva, 17-20 October. 2011.
13. WHO. Weekly epidemiological record. 2014, 89(21).

ИНФЕКТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

О.В.Бухарин¹, И.Н.Чайникова^{1,2}, Е.В.Иванова¹, Н.Б.Перунова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.И.Смолягин²

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНОГО БИОТОПА ЧЕЛОВЕКА

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Сравнительное изучение иммунорегуляторных свойств метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека. *Материалы и методы.* В качестве доминантной микробиоты использовали 260 штаммов бифидобактерий, ассоциативных микросимбионтов — 132 культуры условно патогенных бактерий и грибов из 122 кишечных микросимбиоценозов. Продукцию цитокинов изучали у культур мононуклеаров, сокультивируемых с супернатантами микросимбионтов. Результаты обработаны статистически (Statistica 10.0). *Результаты.* При эубиозе доминантные и ассоциативные микросимбионты проявляли гетерогенность иммунорегуляторных свойств. В отношении флогенных цитокинов ассоцианты в равной степени проявляли стимуляцию/супрессию/отсутствие влияния на цитокины, за исключением энтерококков и бактероидов, стимулирующих секрецию ИЛ-8, и лактобацилл, индуцирующих ИФН γ . Доминанты характеризовались однонаправленностью эффекта: стимуляция секреции ИЛ-10 и супрессия ФНО α , ИФН γ и ИЛ-17 при сохранении индукции ИЛ-10 при дисбиозе. Напротив, супернатанты ассоциантов сочетанно увеличивали продукцию оппозитных цитокинов: раннего провоспалительного цитокина ФНО α , иммунорегуляторного цитокина ИФН γ и противовоспалительного цитокина ИЛ-10. *Заключение.* Кишечный гомеостаз при эубиозе поддерживается дифференцированным воздействием метаболитов микросимбионтов на продукцию про-, противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов с формированием оптимального баланса, ограничивающего воспалительные и аутоиммунные реакции. В условиях дисбиоза у доминантов сохраняется направленность иммунорегуляторных свойств, у ассоциантов — ограничивается разнообразие эффектов влияния на про-/противовоспалительные цитокины.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 42—51

Ключевые слова: бифидобактерии, ассоциативные микросимбионты, симбиоз, эубиоз, дисбиоз, цитокины, иммунный гомеостаз кишечника

О.В.Бухарин¹, И.Н.Чайникова^{1,2}, Е.В.Иванова¹, Н.Б.Перунова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.И.Смолягин²

IMMUNOREGULATORY PROFILE OF MICROSymbionTS OF THE INTESTINAL HUMAN BIOTOPE

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. To study in comparison immunoregulatory properties of dominant and associative microsymbiotes metabolites in human large intestine's eubiosis and dysbiosis. *Materials and methods.* 260 strains of bifidobacteria used as dominant microbiota, 132 cultures of conditionally pathogenic bacteria and fungi used as associative microsymbiotes from 122 intestinal microsymbiocenes. The cytokines production was studied in cultures of mononuclear cells co-cultivated with

microsymbionts' supernatants. The results were processed statistically (Statistica 10.0). *Results.* In eubiosis, dominant and associative microsymbionts showed immunoregulatory properties heterogeneity. In the case of phlogogenic cytokines, the associates equally exhibited stimulation / suppression / no effect on cytokines, except for enterococci and bacteroids, stimulating IL-8 secretion, and lactobacilli, inducing IFN γ . Dominants were characterized by a unidirectional effect: IL-10 secretion stimulation and TNF α , IFN γ and IL-17suppression, while retaining the induction of IL-10 in dysbiosis. In contrast, supernatants of the associates combined the opposing cytokines production: the early proinflammatory cytokine TNF α , the immunoregulatory cytokine IFN γ and the antiinflammatory cytokine IL-10. *Conclusion.* Intestinal homeostasis in eubiosis is supported by differentiated effects of microsymbionts' metabolites on the production of antiinflammatory, immunoregulatory cytokines with the formation of an optimal balance, limiting inflammatory and autoimmune reactions. The dominance of the immunoregulatory properties remains intact in the conditions of dysbiosis, and the variety of effects on pro-/antiinflammatory cytokines is limited in the associates.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 42—51

Key words: bifidobacteria, associative microsymbionts, symbiosis, eubiosis, dysbiosis, cytokines, immune intestinal homeostasis

ВВЕДЕНИЕ

Микросимбиоз толстого кишечника человека представляет собой сбалансированную экосистему, в условиях которой происходит взаимодействие микробных компонентов с эффекторами врожденного и адаптивного иммунитета. Способность микросимбионтов и их метаболитов участвовать в ограничении воспалительных реакций и поддержании толерантности иммунного ответа связана с моделированием про- и противовоспалительного цитокинового профиля в среде обитания, изменением соотношения иммунорегуляторных цитокинов, влияющих на направленность иммунного ответа Т-хелперов в сторону Th1-варианта с последующим уравниванием Th1, Th2, Th3/ Th1 механизмов [7, 10, 14]. Все это определяет участие микросимбионтов в процессах регуляции и поддержании кишечного гомеостаза посредством формирования адекватного цитокинового баланса. Молекулярные механизмы взаимодействия «микроорганизм — микробные метаболиты — иммунные клетки хозяина» в настоящее время продолжают расшифровываться. Показано, что иммуномодулирующее действие микросимбионтов реализуется путем активации генов ряда цитокинов в иммунных и эпителиальных клетках, определяя тем самым гетерогенность их иммуномодулирующих свойств [2]. Цитокины могут обладать прогностической значимостью при развитии воспаления в кишечнике и являться мишенями для терапевтических воздействий [8, 13], в том числе препаратов, использующихся для коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у человека, а также для создания рекомбинантных пробиотических штаммов с заданным цитокиновым профилем [3, 4].

Несмотря на этот очевидный факт, комплексных исследований, затрагивающих одновременно оценку влияния метаболитов различных групп микросимбионтов, выделенных из кишечника при эубиозе и дисбиозе 1 — 3 степени, на продукцию различных функциональных классов цитокинов мононуклеарами периферической крови человека до сих пор не проводилось. Учитывая феномен транслокации бактериальной флоры при тяжелых нарушениях микросимбиоза кишечника биотопа, культуры мононуклеарных клеток периферической крови человека представляются удобной моделью

для изучения иммунорегуляторной функции нормофлоры и участия различного вида комменсалов в формировании определенного цитокинового баланса при дисбиотических состояниях.

Целью исследования явилось сравнительное изучение иммунорегуляторных свойств метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 260 штаммов бифидобактерий, выделенных при обследовании 122 лиц в возрасте от 1 года до 45 лет на дисбиоз толстого кишечника. В работе также были использованы клинические штаммы облигатно-анаэробных бактерий (36 штаммов) (*Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*), факультативно-анаэробных микроорганизмов (84 штамма) (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) и 12 культур лактобацилл (*Lactobacillus ghamnosus*), изолированных из кишечного микросимбиоза человека. При обследовании пациентов на дисбиоз толстого кишечника человека были соблюдены акты национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 о надлежащей клинической практике. Деление обследуемых лиц на возрастные группы для оценки состояния микрофлоры проводили в соответствии с приказом Минздрава РФ № 231 (9.06.2003). Выделение и идентификацию штаммов микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами.

Для получения метаболитов (супернатантов) 24 — 48-часовую бульонную культуру микросимбионтов двукратно центрифугировали при 3000 об/мин и готовили фильтрат (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, «Millipore», USA). Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077 г/см³. Продукцию цитокинов изучали у нестимулированных культур мононуклеаров, сокультивируемых с метаболитами микросимбионтов (опыт) и без добавления метаболитов (контроль) после 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640. В супернатантах опытных и контрольных проб измеряли уровень провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6), хемокинов (ИЛ-8), иммунорегуляторных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-17) и противовоспалительного цитокина ИЛ-10 методом ИФА («Цитокин», Россия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Результат оценивали по изменению концентрации цитокинов в опыте и контрольных пробах. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровень статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди эубиотических штаммов бифидобактерий примерно в равной степени выделялись штаммы, супернатанты которых в условиях *in vitro* в отношении провоспалительных цитокинов проявляли ингибирующий эффект

(71,4% — в отношении ИЛ-8; 35,7% — в отношении ФНО α ; 39,2% — в отношении ИЛ-6; 60,7% — в отношении ИФН γ) или не изменяли продукцию указанных цитокинов мононуклеарами (10,7% — в отношении ИЛ-8; 38,6% — в отношении ФНО α ; 57,1% — в отношении ИЛ-6; 32,0% — в отношении ИФН γ). Вместе с тем, во влиянии на секрецию ИЛ-17 и ИЛ-10 штаммы бифидобактерий были достаточно однородны: супернатанты всех исследуемых изолятов подавляли продукцию ИЛ-17 и, напротив, 67,9% стимулировали секрецию ИЛ-10. Доля штаммов бифидобактерий, ингибирующих секрецию ИЛ-10, составила 10,7% и не влияющих на его секрецию — 21,4%. Диапазон колебаний уровня цитокинов в культуральной среде в присутствии метаболитов доминантов составил для ФНО α — 8,72 — 85,96 пг/мл (в контроле — 42,66 \pm 7,56 пг/мл), для ИЛ-6 — 398,8 — 552,2 пг/мл (в контроле — 514,66 \pm 87,5 пг/мл), для ИЛ-8 — 676 — 870 пг/мл (в контроле — 931,1 \pm 98,2 пг/мл), для ИФН γ — 4,44 — 33,77 пг/мл (в контроле 18,11 \pm 2,31 пг/мл), для ИЛ-17 — 20,44 — 43,11 пг/мл (в контроле — 140,5 \pm 45,3 пг/мл), для ИЛ-10 — 14,31 — 121,93 пг/мл (в контроле — 50,03 \pm 7,56 пг/мл).

Штаммы ассоциантов (кишечная палочка, лактобациллы, энтерококки, бактероиды) в условиях эубиоза характеризовались неоднородностью по эффекту влияния их супернатантов на секрецию исследуемых цитокинов. Так, на секрецию ФНО α они оказывали в равной степени как стимулирующий, так и ингибирующий эффект, при этом уровень ФНО α в культуральной среде в присутствии бактериальных метаболитов изменялся в диапазоне 12,7-156,2 пг/мл. Влияние на продукцию ИЛ-6, ИФН γ , ИЛ-17, ИЛ-10 у штаммов ассоциантов характеризовалось как оппозитными эффектами, так и отсутствием влияния метаболитов на секрецию данных цитокинов за исключением штаммов кишечной палочки, бактероидов и лактобацилл, супернатанты большинства которых усиливали секрецию ИФН γ , одного из ведущих цитокинов, индуцирующих клеточные иммунные реакции. Для эубиотических ассоциантов уровень цитокинов изменялся в следующих диапазонах: для ИЛ-6 — 388,2—487,2 пг/мл, для ИФН γ — 10,44-88,4 пг/мл, для ИЛ-17 — 13,9 — 142,9 пг/мл и для ИЛ-10 — 18,7 — 213,6 пг/мл. Следует отметить, что супернатанты энтерококков в 77,8% случаев и бактероидов (44%) проявляли умеренную (на 30% от уровня в контроле) стимулирующую активность в отношении хемокина ИЛ-8, одного из самых ранних провоспалительных цитокинов, секреция которого возрастает при различных стимулах (продукты метаболизма бактерий, вирусов), в том числе и на провоспалительные цитокины ИЛ-1, ФНО α . Концентрация ИЛ-8 в среде в присутствии метаболитов энтерококков составляла 692,1 — 1079 пг/мл, бактероидов — 839,7 — 921 пг/мл.

Таким образом, цитокиновый профиль как результат воздействия на мононуклеары *in vitro* супернатантов доминантных симбионтов бифидобактерий при эубиозе характеризовался преобладанием негативного или индифферентного влияния на секрецию провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6), хемокинов (ИЛ-8), иммунорегуляторных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-17) и стимулирующим влиянием на секрецию противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Цитокиновый баланс под влиянием супернатантов ассоциантов, выделенных при эубиозе, формировался за счет равномерного распределения штаммов с различным эффектом влияния на секрецию провоспалительных, иммунорегуляторных и противовоспалительных цитокинов (стимулирующий/ингибирующий или индифферентный).

Супернатанты штаммов бифидобактерий, выделенных от обследуемых с 1 степенью дисбиоза, по влиянию на секрецию ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН γ , как и при эубиозе, проявляли преимущественно ингибирующий эффект или не изменяли продукцию указанных цитокинов лимфоцитами человека, а в отношении ИЛ-17, как и эубиотические изоляты, оказывали супрессирующий эффект. Обращает на себя внимание, что в отношении ИЛ-10, по сравнению с эубиозом, штаммы бифидобактерий, выделенные от обследуемых с 1 степенью дисбиоза, характеризовались различными эффектами влияния: супернатанты (66% изолятов) стимулировали секрецию ИЛ-10, остальные в равной мере подавляли продукцию противовоспалительного цитокина или не влияли на его уровень в культуральной среде.

При 1 степени дисбиоза из фекалий обследуемых высевались такие ассоцианты, как клебсиеллы, клостридии, грибы рода *Candida*. В отношении влияния супернатантов указанных культур на секрецию цитокинов выявлялись различные эффекты. Так, все выделенные штаммы *S. albicans*, большинство изолятов клостридий (90%) не влияли на секрецию ИЛ-6. Супернатанты культур бактероидов и энтерококков практически в 100% стимулировали секрецию ФНО α . Стимулирующий эффект был выявлен и в отношении ИЛ-8 и ИФН γ у супернатантов всех выделенных штаммов клостридий, энтерококков, лактобацилл, напротив, в отношении ИЛ-17 они проявляли ингибирующее влияние. Что касается противовоспалительного цитокина ИЛ-10, то среди ассоциантов выраженный стимулирующий эффект был выявлен для супернатантов всех штаммов клостридий, тогда как бактероиды, напротив, ингибировали секрецию данного цитокина.

При 2 степени дисбиоза среди культур бифидобактерий уменьшалась доля штаммов, ингибирующих продукцию провоспалительных цитокинов, вместе с тем, способность стимулировать противовоспалительный цитокин ИЛ-10 сохранялась у всех изолятов. Ухудшение состояния микробиоценоза толстого кишечника до уровня 2 степени характеризовалось выделением культур кишечной палочки, клебсиелл, клостридий, бактероидов, *S. aureus*, грибов рода *Candida*, проявляющих в большинстве случаев в отношении наиболее раннего цитокина ФНО α выраженный стимулирующий эффект (от 3-кратного до 5-кратного роста по сравнению с дисбиозом 1 — 2 степени).

В условиях тяжелых нарушений микробиоценоза толстого кишечника (3 степень дисбиоза) снижалась гетерогенность доминантных и ассоциативных культур микробиоты в отношении иммунорегуляторных свойств. Среди выделяемых штаммов бифидобактерий стали преобладать изоляты (98%), стимулирующие секрецию ИФН γ . Более выраженный уровень индукции ФНО α и ИФН γ (до 5-6 кратного роста), по сравнению с уровнем при 1 степени дисбиоза, выявлялся у супернатантов штаммов клебсиелл, клостридий, *S. aureus*, *S. albicans*. Характерно, что при 3 степени дисбиоза снижалась гетерогенность дрожжевых грибов и в отношении влияния на секрецию ИЛ-17. Стимулирующий эффект стал превалировать практически у всех исследуемых штаммов *S. albicans*. Остальные виды ассоциантов проявляли или ингибирующий эффект, или не влияли на продукцию ИЛ-17. В отношении ИЛ-6 сохранялась гетерогенность проявлений иммуномодулирующих свойств как у доминантов, так и у культур ассоциантов. При анализе эффектов влияния супернатантов микросимбионтов на секрецию ИЛ-8 было установлено исчезновение штаммов бифидобактерий, подавляющих его секрецию (80%

штаммов стимулировали продукцию, 20% — не влияли). Практически все штаммы исследуемых ассоциантов стимулировали секрецию хемокина, лишь 44% изолятов клебсиелл не влияли на его уровень.

Несмотря на тяжелые микрoэкологические нарушения, присущие 3 степени дисбиоза, бифидобактерии сохраняли способность стимулировать секрецию ИЛ-10. Выраженный стимулирующий эффект на продукцию ИЛ-10, как и при дисбиозе 2 степени, сохраняли супернатанты клостридий и *S. aureus*, а выраженный ингибирующий эффект на секрецию ИЛ-10 оказывали супернатанты бактериоидов и клебсиелл.

Таким образом, под влиянием метаболитов штаммов как доминантных, так и ассоциативных микросимбионтов, изолированных из кишечника с выраженными нарушениями микросимбиоза, изменялся цитокиновый профиль иммунных клеток. Для мононуклеаров человека преобладающим становился провоспалительный спектр цитокинов, секретируемых под влиянием метаболитов кишечной микрофлоры. Так, среди бифидобактерий возрастало количество изолятов, супернатанты которых характеризовались способностью усиливать секрецию цитокинов из функциональных групп, пролонгирующих воспаление: хемокина (ИЛ-8) и иммунорегуляторного цитокина (ИФН γ). Вместе с тем, у бифидобактерий сохранялась доля штаммов, индуцирующих секрецию противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Значительный вклад в усиление провоспалительного фона в кишечном биотопе при тяжелых нарушениях микросимбиоза могут вносить такие микросимбионты, как бактериоиды, клебсиеллы, грибы рода *Candida*, золотистый стафилококк, клостридии. Супернатанты культур этих микроорганизмов 4 — 5-кратно увеличивали, по сравнению дисбиозом 1 степени, продукцию лимфоцитами раннего системного провоспалительного цитокина ФНО α и иммунорегуляторного цитокина ИФН γ .

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности метаболитов кишечной микрофлоры к влиянию на продукцию цитокинов иммунными клетками человека позволило установить ряд особенностей. В условиях нормального микрoэкологического состояния дистального отдела толстого кишечника человека как для доминантов (бифидобактерии), так и для ассоциантов (кишечная палочка, энтерококки, лактобациллы, бактериоиды) характерна гетерогенность в проявлении иммунорегуляторных свойств (рис. 1). При этом в отношении флогогенных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН γ) ассоциантам была присуща способность примерно в равной степени проявлять все три эффекта (стимуляция/супрессия/отсутствие влияния), исключая преобладание среди энтерококков и бактериоидов штаммов, стимулирующих секрецию ИЛ-8, среди лактобацилл — ИФН γ . Для доминантов (бифидобактерий) преобладание одностороннего эффекта проявлялось во влиянии на продукцию ряда цитокинов: стимулирующий эффект для ИЛ-10, супрессирующий — в отношении ФНО α , ИФН γ и ИЛ-17. Тем самым суммарные эффекты воздействия метаболитов комменсальной микрофлоры на секрецию цитокинов иммунными клетками человека в условиях нормы обеспечивают цитокиновый баланс, характеризующийся умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием ИЛ-10, продуцируемого преимущественно популяцией Тreg клеток [6, 14]. При этом следует отметить вклад

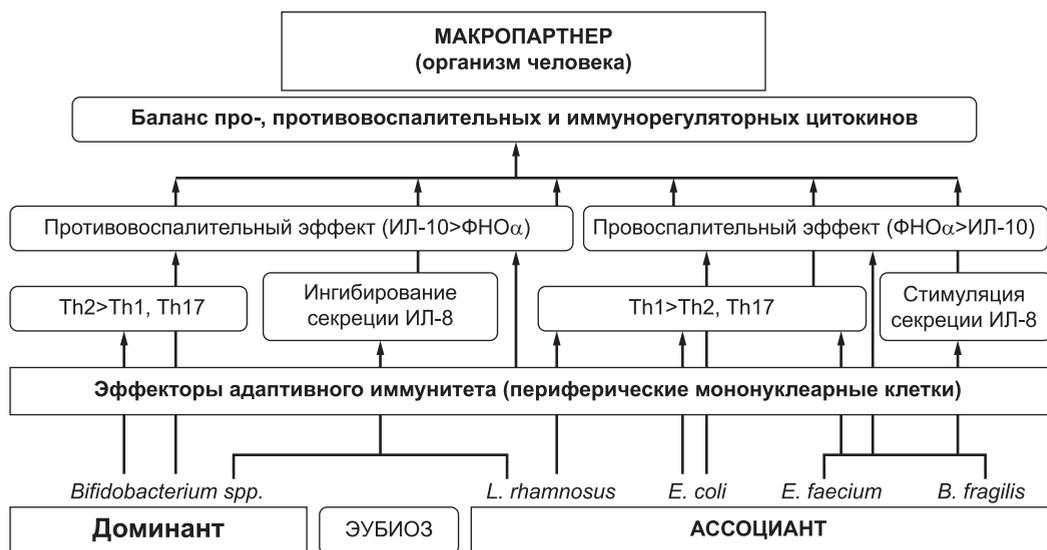


Рис. 1. Формирование цитокиновой среды под влиянием метаболитов микросимбионтов, изолированных при эубиозе толстого кишечника человека.

Медиаторы Th1 — ИФН γ , Th2 — ИЛ-6, Th17 — ИЛ-17, хемокин — ИЛ-8 (здесь и на рис. 2).

таких компонентов метаболитов анаэробной флоры, как короткоцепочные жирные кислоты, которые способны связываться с рецепторами ассоциированных с кишечником иммунных клеток [7]. С другой стороны, известно, что экзополисахариды, секретируемые молочнокислыми бактериями нормофлоры (бифидобактериями и лактобациллами), индуцируя синтез цитокинов, стимулируют фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [11].

В условиях эубиоза кишечного биотопа иммунорегуляторные свойства доминантных и ассоциативных микросимбионтов гетерогенны по направленности, спектру и выраженности (индукция/ ингибция/ отсутствие влияния) секреции иммунными клетками цитокинов в ответ на метаболиты комменсалов, что важно при формировании кишечного иммунного гомеостаза. Данные свойства нормальной микробиоты, с одной стороны, реализуют ее способность предотвращать развитие локальных воспалительных реакций, с другой — обеспечивать развитие необходимой ответной реакции иммунных клеток при проникновении в кишечник условно патогенных микроорганизмов (УПМ) и патогенов [10]. Умеренно повышенное содержание провоспалительных цитокинов является необходимым для контроля инфекции, в этом проявляется позитивный эффект выявленного разнообразия стимулирующего влияния комменсалов на секрецию ранних цитокинов — ФНО α и ИЛ-8. Однако следует учитывать, что при избыточной продукции такое воздействие комменсалов может привести к повреждению тканей, структурными элементами которых являются клетки — продуценты цитокинов [8, 9].

В условиях нарастания антигенной нагрузки при дисбиозе через активацию Toll-like рецепторов усиливается продукция целого спектра провоспалительных цитокинов, которые способствуют как развитию локального воспаления, так и запуску эффекторных иммунных реакций в лимфоидных образованиях кишечника, защищающих организм от патогенов [12]. Выявленное при 3 степени дисбиоза кишечника усиление секреции метаболитами доми-

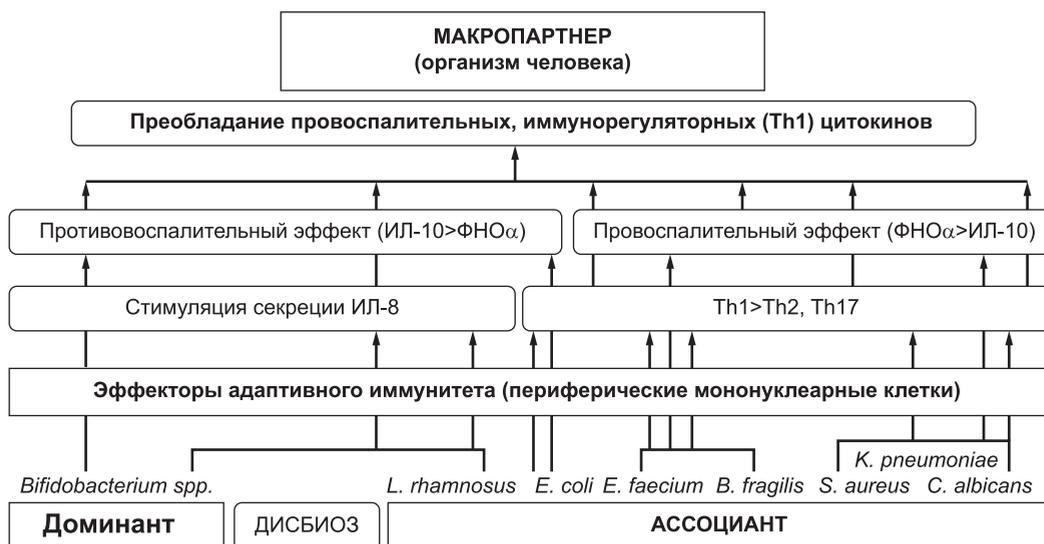


Рис. 2. Формирование цитокиновой среды под влиянием метаболитов микросимбионтов, изолированных при дисбиозе толстого кишечника человека.

нантной и ассоциативной микрофлоры ИФН γ (медиатора ответа Th1 типа) в условиях *in vivo* в кишечном биотопе может ассоциировать с индукцией у Т-клеток цитотоксической активности (рис. 2), избыток которой оказывает повреждающее действие. Повышенное содержание ИФН γ в копрофильтратах в условиях дисбактериоза кишечника с увеличением содержания УПМ рассматривается как информативный маркер дисбиоза кишечника [1]. Если степень активации ИФН γ метаболитами кишечных ассоциантов (3 степень дисбиоза) перестает быть адекватной, тогда первоначально защитный механизм регуляции кишечного гомеостаза перерастает в патологический. Несмотря на то, что ИФН γ оказывает иммуностимулирующее действие, при его избыточной продукции он может быть иммуносупрессивным фактором, способствующим персистенции УПМ.

Усиление продукции ИЛ-17 под влиянием метаболитов культур грибов рода *Candida*, колонизирующих кишечник при 3 степени дисбиоза, на фоне индифферентного воздействия таких ассоциантов, как клостридии, клебсиеллы, золотистый стафилококк, выступает существенным механизмом усиления провоспалительного профиля цитокинов. Вместе с тем, снижение продукции ИЛ-17 под влиянием анаэробных культур бифидобактерий, бактероидов, кишечных палочек, колонизирующих кишечник при 3 степени дисбиоза, выступает механизмом защитного действия нормальной анаэробной микрофлоры через ограничение участия данного цитокина (одновременно индуцируемого дисбиотическими штаммами *S. albicans*) в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, а также в мобилизации гранулоцитов, поддерживающей остроту воспалительной реакции и отражающей специфику Th-17-опосредованного воспаления [5, 6, 9].

Рассматривая полученные в работе данные об увеличении при 3 степени дисбиоза доли штаммов микросимбионтов, способных к гиперпродукции ФНО α , следует отметить, что это может являться одним из механизмов активации пролонгированного воспаления на фоне высокой концентрации

ИЛ-10. Результаты работы свидетельствуют о том, что наряду с усилением продукции провоспалительных цитокинов при наиболее тяжелых микробиологических нарушениях в толстом кишечнике у выделенных культур микросимбионтов одновременно возрастала и доля штаммов, стимулирующих секрецию ИЛ-10, который, с одной стороны, оказывает супрессирующее воздействие на эффекторы клеточного и гуморального иммунитета, с другой — его секреция преобладает при поляризации Т-хелперов в сторону Th2 клеток. Возрастание продукции ИЛ-10 под влиянием супернатантов ассоциантов (кlostридии, дрожжевые грибы, кишечные палочки, золотистый стафилококк), колонизирующих дистальные отделы толстого кишечника при 3 степени дисбиоза, можно расценивать как проявление ауторегуляторной функции иммунной системы, ассоциированной с лимфоидной тканью кишечника, в виде включения супрессорного фактора (ИЛ-10), лимитирующего избыточную цитотоксичность и, соответственно, выраженность иммунного воспаления благодаря способности включать апоптотический механизм гибели активированных Т-клеток избыточным количеством самих микросимбионтов, компонентов их клеточной стенки и продуктами метаболизма [9].

Таким образом, полученные результаты дают основание полагать, что базовым фактором поддержания кишечного гомеостаза в условиях эубиоза является способность метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов оказывать дифференцированное воздействие по направленности, спектру и выраженности (индукция/ ингибция/ отсутствие влияния) на продукцию цитокинов разных функциональных групп (про-, противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, хемокинов). В результате этого суммарные эффекты воздействия метаболитов комменсальной микрофлоры на секрецию цитокинов иммунными клетками человека в условиях нормы обеспечивают оптимальный цитокиновый баланс с умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием антифлогенных цитокинов. По мере усиления выраженности дисбиоза у ассоциативных микросимбионтов снижается диапазон разнообразия штаммоспецифичности в отношении иммуномодулирующих свойств с преобладанием культур, сочетанно индуцирующих высокий уровень оппозитных цитокинов (про/антивоспалительные). Тем не менее, благодаря способности большинства штаммов доминантных представителей микробиоты сохранять направленность иммуномодулирующего влияния на баланс цитокинов в условиях выраженного дисбиоза кишечника поддерживается гомеостаз кишечника с ограничением воспалительных и аутоиммунных реакций.

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине», проект № 18-7-8-34.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гапон М.Н., Терновская Л.Н., Денисенко О.В., Зарубинский В.Я. Показатели иммунитета и локальной защиты у людей с дисбактериозом кишечника. Журн. микробиол. 2014, 4: 65-68.
2. Зорина В.В., Николаева Т.Н., Наровлянский А.Н. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на продукцию цитокинов клетками пейеровых бляшек экспериментальных животных. Иммунология, 2004, 5: 288-290.
3. Carvalho R.D.D.O., do Carmo F.L.R., de Oliveira Junior A. et al. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8:800. doi:10.3389/fmicb.2017.00800.

4. de Moreno de LeBlanc A., Del Carmen S., Chatel J.M. et al. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015;146972. doi: 10.1155/2015/146972.
5. Kim D., Yoo S.A., Kim W.U. Gutmicrobiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch Pharm Res.* 2016, 39 (11): 1565-1576.
6. Kim D., Zeng M.Y., Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Experimental Molecular Medicine.* 2017, 49(5): e339-. doi:10.1038/emm.2017.24.
7. Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016, 165: 1332-1345.
8. Lee S.H., Kwon J., Cho M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research.* 2018, 16 (1): 26-42.
9. Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaïss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17 (4): 219-232.
10. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology.* 2017, 18:2. doi:10.1186/s12865-016-0187-3.
11. Llewellyn A., Foey A. Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients.* 2017, 9 (10): 1156. doi:10.3390/nu9101156.
12. Mowat A.M., Bain C.C. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *Journal of Innate Immunity.* 2011, 3 (6): 550-564.
13. Nakase H., Okazaki K., Tabata Y. et al. New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 301 (1): 59-65.
14. Pagliari D., Gambassi G., Piccirillo C.A. et al. The Intricate Link among Gut Immunological Niche, Microbiota, and Xenobiotics in Intestinal Pathology. *Mediators of Inflammation.* 2017:8390595. doi:10.1155/2017/8390595.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Ю.С.Шишкова¹, В.Ф.Долгушина¹, Е.Д.Графова¹, С.А.Завьялова², И.В.Курносенко¹, Н.П.Евстигнеева³, К.Г.Громакова¹, О.Л.Колесников¹, А.В.Чукичев¹, И.И.Долгушин¹

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СЕКРЕТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ВИДОВЫМ СОСТАВОМ ЛАКТОФЛОРЫ

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, ²ГКП № 5, Челябинск; ³Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии, Екатеринбург

Цель. Определить функциональный статус нейтрофилов цервикального секрета у женщин в I триместре беременности в зависимости от видового состава лактофлоры. *Материалы и методы.* У обследованных 40 беременных женщин проводили масс-спектрометрическую видовую идентификацию влагалищных лактобацилл, оценивали их способность к образованию биопленок, изучали жизнеспособность, лизосомальную активность, спонтанный и индуцированный НСТ-тест, способность к поглощению частиц латекса нейтрофилами цервикальной слизи. Выделенные штаммы были разделены на 3 группы в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного процесса влагалища и/или цервикального канала. *Результаты.* Среди выделенных 40 штаммов лактобацилл было идентифицировано 5 видов: *L.jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L.gasseri*, *L. delbrueckii*. В условиях нормоценоза показана различная интенсивность фагоцитоза частиц латекса нейтрофилами цервикального секрета в зависимости от доминирующего вида: при доминировании *L. crispatus* отмечена наименьшая интенсивность фагоцитоза, по сравнению с *L. acidophilus* и *L.jensenii*. При наличии генитальной инфекции лактобациллы способны интенсивно секретировать биоматрикс, блокируя свой антигенный потенциал, что сопровождается отсутствием НСТ-редуцирующей способности нейтрофильных гранулоцитов и снижением антимикробной защиты слизистой оболочки

генитального тракта беременной женщины. *Заключение.* Показатели функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета зависят от доминирующего вида лактобацилл влагалища у беременных женщин в I триместре.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 51—56

Ключевые слова: лактобациллы, функциональный статус нейтрофилов, биопленкообразование, I триместр беременности

Yu.S.Shishkova¹, V.F.Dolgushina¹, E.D.Grafova¹, S.A.Zavyalova², I.V.Kurnosenko¹, N.P.Evstigneeva³, K.G.Gromakova¹, O.L.Kolesnikov¹, A.V.Chukichev¹, I.I.Dolgushin¹

CERVICAL MUCUS NEUTROPHILS FUNCTIONAL STATUS INTERACTION WITH THE SPECIES COMPOSITION OF VAGINAL LACTOBACILLI IN PREGNANT WOMEN

¹South Ural State Medical University, ²State Clinical Outpatient Clinic No. 5, Chelyabinsk; ³Ural Research Institute of Dermatology, Venerology and Immunopathology, Ekaterinburg, Russia

Aim. Of the study is to assess cervical mucus neutrophils functional status depend on dominant lactobacillus strain in I trimester of pregnancy women. *Material and methods.* We defined 40 lactobacillus strains obtained from the genital tract of the pregnant women. We used mass spectrometry analysis to identify vaginal lactobacilli and evaluated biofilm formation. Also, we studied cervical mucus neutrophils viability, lysosomal activity, spontaneous and induced NBT test (Nitroblue Tetrazolium test), ability to absorb the latex particles. Isolated strains were divided into 3 groups depending on presence or absence of vaginal or cervical channel infectious diseases. *Results.* We identified 5 lactobacilli types: *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* among 40 defined strains. We determined different intensity of phagocytosis depending on dominant strain in normocenosis. With the *L. crispatus* prevalence demonstrated the least intensity of phagocytosis compared with *L. acidophilus* and *L.jensenii*. Lactobacilli able to intensively produce biomatrix in condition of genital infection. Thus blocking antigenic potential and result in absence of NBT-reducing power of neutrophilic granulocytes and reduction antimicrobial protection of pregnant women genital tract mucosa. *Conclusion.* The indicators of neutrophils functional status depend on dominant lactobacilli strain in I trimester of pregnancy women

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 51—56

Key words: lactobacilli, neutrophils functional status, biofilm formation, I trimester of pregnancy

ВВЕДЕНИЕ

Среди видового многообразия влагалищных микроорганизмов лидирующее место в вагинальном биоценозе занимают лактобациллы, поддерживающие нормальное его функционирование. Лактобациллы обеспечивают колонизационную резистентность влагалища, предотвращая развитие генитальной инфекции, что особенно важно во время беременности для благоприятных перинатальных исходов. В литературе имеются данные о видовом составе лактофлоры у женщин репродуктивного возраста во время и вне беременности. Известно более 10 видов лактобацилл, колонизирующих репродуктивный тракт женщин, однако ведущими являются *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* [2, 6, 8]. В литературных источниках имеются данные о том, что от вида лактобацилл зависит ста-

бильность влагалищного биотопа. Так, доминирование *L. crispatus* на ранних сроках беременности обеспечивает стабильность вагинальной нормофлоры на протяжении гестации, а присутствие вида *L. iners* на ранних сроках беременности является фактором риска преждевременных родов [5, 8]. Одним из факторов, обеспечивающих колонизационную резистентность вагинального эпителия, является способность к формированию лактобациллами биопленок, которая зависит от их видовой принадлежности [4, 7]. Кроме того, в цервикальной слизи и на поверхности вагинального эпителия функционирует значительное количество нейтрофилов, которые участвуют в формировании микробиоценозов слизистых оболочек [3].

При этом остается неясным взаимодействие нейтрофилов и лактобацилл разных видов на поверхности слизистых оболочек репродуктивной системы беременных женщин.

Целью настоящего исследования явилось определение функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета у женщин в I триместре беременности в зависимости от видового состава лактофлоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели были обследованы 40 женщин, вставших на учет по беременности на сроке до 12 недель в ГКП № 5 Челябинска. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Всем беременным женщинам проводилось клиническое обследование, гинекологическое обследование, микробиологическое и иммунологические исследования. Взятие отделяемого влагалища для микробиологического исследования осуществляли стерильным тампоном в пробирку с транспортной средой Amies (Италия). Цервикальную слизь в количестве 30 — 50 мкл вносили в пробирки типа Эппендорф, содержащие 1,0 мл раствора Хенкса. Первичный материал доставляли в лабораторию в течение 2 часов. Для получения культур лактобацилл первичный посев вагинального содержимого проводился полуколичественным методом «тампон-петля» на 5% кровяной агар, посеvy инкубировали в микроаэрофильных условиях в течение 48 часов, определяли степень обсеменения пробы, результат выражали в десятичном логарифме. Идентификацию лактобацилл осуществляли с помощью масс-спектрометрического метода на базе УрНИИДВиИ (Екатеринбург) с последующей интерпретацией результатов с использованием базы данных VITEK MS. Матрикссинтезирующую способность выделенных лактобацилл определяли в лунках стерильного пластикового планшета для иммуноферментного анализа: в среде MRS суспензировали суточные культуры в концентрации микроорганизмов 10^5 КОЕ/мл и вносили в лунки планшета по 100 мкл, инкубировали 48 часов при 37°C в микроаэрофильных условиях, затем содержимое лунок удаляли, после вносили по 120 мкл 1% спиртового раствора фуксина в каждую лунку, инкубировали в течении 20 минут при комнатной температуре. Для экстракции красителя из биопленки использовали 96% этиловый спирт. Учет проводили на микропланшетном фотометре Anthos 2020. Значения оптической плотности отражали количественную оценку степени выраженности образования биопленки. При изучении функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета оценивали их жизнеспособность, лизосомальную активность, спонтанный и индуцированный НСТ-тест, способность к поглощению частиц латекса [1]. Статистическая обработка про-

водилась с помощью статистического пакета SPSS 12.1. Полученные данные выражены в виде медианы и квартилей. Для оценки различий между группами применяли U-критерий Манна-Уитни, учитывая значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании масс-спектрометрического анализа у обследованных беременных женщин были обнаружены 5 видов лактобацилл — *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*. Все выделенные штаммы лактобацилл были разделены на 3 группы в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного процесса в генитальном тракте беременных женщин. В 1 группу вошли 13 штаммов лактобацилл, выделенных от женщин с признаками бактериального вагиноза или дисбиоза влагалища. 2 группу составили 15 штаммов, полученных от пациенток с воспалительной патологией нижнего отдела генитального тракта (кольпит и/или цервицит). 12 штаммов лактобацилл, выделенных от беременных женщин с отсутствием клинико-лабораторных признаков генитальной инфекции (нормоценоз влагалища), составили 3 группу.

В результате проведенных исследований были отмечены особенности видового состава лактофлоры у женщин в 1 триместре беременности при нормоценозе и развитии инфекционного процесса нижнего отдела генитального тракта. Так, доминирующим видом при нормоценозе являлся вид *L. jensenii* (выделен в 41,6% случаев). В 33,3% случаев выделяли *L. crispatus* и в 25% — *L. acidophilus*. Во 2 группе при дисбиотических процессах влагалища в одинаковом проценте случаев (38,5%) определяли *L. jensenii* и сочетание *L. acidophilus* + *L. gasseri*, реже выделяли *L. crispatus* (23%). В 3 группе при воспалительных процессах слизистых оболочек влагалища и/или цервикального канала определяли большее видовое разнообразие лактобацилл: в 40% случаев наблюдали сочетание *L. acidophilus* + *L. gasseri*, в 26,6% случаев определяли *L. jensenii*, в 20% — *L. acidophilus*, в единичных случаях — *L. gasseri* (6,7%) и *L. delbrueckii* (6,7%).

У всех выделенных штаммов лактобацилл определяли матриксинтезирующую способность *in vitro*. При этом более выраженное биопленкообразование отмечено у штаммов, полученных от беременных женщин с генитальной инфекцией. Показатель оптической плотности экстрагированного красителя из биопленки лактобацилл группы пациенток с нормоценозом влагалища (3 группа) составил 0,164 (0,160...0,170); при инфекционном процессе нижних отделов генитального тракта этот показатель достоверно увеличивался: в образцах 1 исследуемой группы оптическая плотность составила 0,174 (0,171...0,180), $p_{1-3} = 0,004$, а во 2 группе — 0,191 (0,170...0,210), $p_{2-3} = 0,006$.

Оценку функционирования нейтрофилов цервикального секрета проводили в зависимости от преобладающего вида лактобацилл во влагалище беременных женщин. С этой целью сравнили показатели жизнеспособности и функционального статуса нейтрофилов в условиях нормоценоза (3 группа) и при наличии генитальной инфекции (дисбиотических процессов или воспалительных реакций — 1+2 группа). В условиях нормоценоза нами была зарегистрирована различная поглотительная способность фагоцитов в зависимости от преобладающего вида лактофлоры. Нейтрофилы цервикального секрета слабо фагоцитировали частицы латекса при наличии во влагалище *L. crispatus*, при колонизации вагинального эпителия *L. jensenii* и *L. acidophilus* данный показатель был значительно выше. Показатели НСТ-редуцирующей

Показатели функционального статуса нейтрофилов в зависимости от видового состава лактофлоры, Ме [25; 75]

Статус нейтрофилов	L. acidophilus		L. crispatus		L.jensenii	
	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)
	1	2	3	4	5	6
Лизосомальная активность	21 (5...68,5)	51 (16,5...72)	55 (6,5...55)	133 (0...133)	11,5 (7,5...36,5)	35 (22...72)
Лейкоциты, % живых клеток	29 (18,2...47,6)	22,5 (20...25)	56,25 (28...80)	70,6 (0...70,6)	21,7 (18,6...57,5)	32,6 (20...57,3)
НСТ-спонтанная активность, %	19 (4,25...51,75)	9 (7,5...24,75)	13,5 (1,5...48,75)	14 (6...14)	25 (18,2...52,7)	1 (0...9)
					p5-6=0.042	
НСТ-спонтанная активность (индекс), усл.ед.	0,12 (0,05...0,38)	0,12 (0,06...0,31)	0,15 (0,015...0,57)	0,22 (0,06...0,22)	0,41 (0,19...0,75)	0 (0...0,12)
					p5-6=0.042	
НСТ-индуцированная активность, %	5 (1,35...7,75)	10 (7,75...28)	2,4 (0,2...7,7)	12 (9...12)	10,5 (3,5...55,7)	0 (0...10)
НСТ-индуцированная активность (индекс), усл.ед	0,08 (0,43...0,48)	0,15 (0,09...0,34)	0,03 (0,01...0,08)	0,15 (0,12...0,15)	0,15 (0,04...0,845)	0 (0...0,65)
Активность фагоцитоза, %	20,5 (10,75...34)	15,5 (4...27)	8 (5,5...29,2)	18 (12...18)	26,5 (14...54)	20 (14...48)
Интенсивность фагоцитоза, усл.ед.	0,38 (0,13...1,95)	0,1 (0,05...0,11)	0,075 (0,06...0,09)	0,19 (0,16...0,19)	0,65 (0,26...1,3)	0,16 (0,11...1,14)
	p1-3=0.029				p3-5=0.029	

способности нейтрофилов при нормоценозе вагинального эпителия в присутствии *L. jensenii* в нижнем отделе генитального тракта были сопоставимы с аналогичными показателями при обнаружении *L. crispatus* и *L. acidophilus*. При инфекционном процессе в генитальном тракте, в присутствии *L. jensenii* во влагалище беременных женщин, кислород-зависимая микробицидность нейтрофилов значительно снижалась (табл.).

Таким образом, нами отмечено изменение лидирующих позиций и повышение матрикссинтезирующей способности резидентной флоры вагинального эпителия у женщин в 1 триместре беременности при генитальной инфекции на *L. acidophilus* и *L. gasseri*, тогда как при нормоценозе доминируют *L. jensenii* и *L. crispatus*. Определены особенности функционирования нейтрофильных гранулоцитов цервикального секрета у беременных женщин в зависимости от видовой принадлежности вагинальных лактобацилл. Нейтрофилы цервикального секрета слабо фагоцитируют частицы латекса при наличии во влагалище *L. crispatus*, при колонизации вагинального эпителия *L. jensenii* и *L. acidophilus* данный показатель был значительно выше. В условиях нормоценоза и при доминировании *L. jensenii* во влагалище нейтрофилы активно функционируют, проявляя фагоцитарную и микробицидную способность. При наличии генитальной инфекции лактобациллы способны интенсивно секретировать биоматрикс, блокируя свой антигенный потенциал, что сопровождается отсутствием НСТ-редуцирующей способности нейтрофильных гранулоцитов и снижением антимикробной защиты слизистой оболочки генитального тракта беременной женщины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Долгушин И.И., Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф., Савочкина А.Ю., Абрамовских О.С., Шишкова Ю.С., Гизингер О.А., Колбина Е.В., Мезенцева Е.А., Прокопьева О.Б., Маркова В.А. Методы изучения факторов врожденного иммунитета репродуктивной системы женщин. Учебно-методическое пособие для аспирантов. Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2015.
2. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М., Завьялова М.Г. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. Клиническая микробиология, анти-микробная химиотерапия. 2013, 15 (1): 72-79.
3. Шишкова Ю.С. Роль нейтрофилов в формировании колонизационной резистентности слизистых оболочек. Диссертация доктора мед. наук. Челябинск, 2010.
4. Leccesse Terraf M.C. et al. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. J. Applied Microbiology. 2012, 113: 1517-1529.
5. Petricevic L., Domig K.J., Nierscher F.J. et al. Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery. Sci. Rep. 2014, 4: 5136.
6. Romero R., Hassan S.S., Gajer P. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. Microbiome. 2014, 2: 4.
7. Ventolini G. Update on Vaginal Lactobacilli and Biofilm Formation. J. Bacteriology Mycology. 2014, 1 (1): 2.
8. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G. et al. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiology. 2009, 9: 116.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*В.А.Гриценко¹, А.Р.Мавзютов², Т.М.Пашкова¹, О.Л.Карташова¹, Я.В.Тяпаева³,
Ю.П.Белозерцева³*

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ И БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, ²Башкирский государственный медицинский университет, Уфа; ³Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Сравнительная генетическая оценка патогенного потенциала штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. *Материалы и методы.* Методом ПЦР исследовано наличие генов патогенности (*ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB*) у 163 штаммов *S. aureus*, выделенных со слизистой оболочки носовой полости бактерионосителей, из отделяемого влагалища женщин с миомой матки, содержимого пустул новорожденных с перинатальной пиодермией, транссудата венозно-трофических язв нижних конечностей и гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы. *Результаты.* Показано, что частота встречаемости генов *ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB* у клинических штаммов *S. aureus* зависела от источника их выделения. У всех культур *S. aureus* (кроме вагинальных изолятов) наиболее часто обнаруживался ген *ssp* (в 66,7 — 94,6% случаев), который встречался изолированно или в разных комбинациях с другими генами (*sra*, *clfA*, *clfB*). Установлено, что по наличию генов *ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB* генетические профили штаммов *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией (перинатальная пиодермия, гнойные раны при синдроме диабетической стопы) проявляют выраженное сходство. *Заключение.* Обсуждается возможная роль бессимптомного носительства

штаммов *S. aureus*, обладающих патогенным потенциалом, в развитии эндогенных инфекций различной локализации.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 56—62

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, биотопы, генетические детерминанты патогенности

V.A.Gritsenko¹, A.R.Mavzyutov², T.M.Pashkova¹, O.L.Kartashova¹, Ya.V.Tyapaeva³,
Yu.P.Belozertseva³

GENETIC PROFILE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ISOLATED FROM BACTERIAL CARRIERS AND PATIENTS WITH INFECTIOUS INFLAMMATORY PATHOLOGY

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Bashkir State Medical University, Ufa; ³Orenburg State Medical University, Russia

Aim. A comparative genetic evaluation of the pathogenic potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bacterial carriers and patients with infectious inflammatory pathology. *Materials and methods.* The presence of pathogenicity genes (*ssp*, *spa*, *clfA* and *clfB*) in 163 strains of *S. aureus* isolated from the mucous membrane of the nasal cavity of bacterial carriers, from the vaginal discharge of women with uterine myoma, the contents of the pustules of newborns with perinatal pyoderma, and the transudate of venous-trophic ulcers lower limbs and purulent wounds in patients with diabetic foot syndrome. *Results.* It was shown that the frequency of occurrence of *ssp*, *spa*, *clfA* and *clfB* genes in clinical strains of *S. aureus* depended on the source of their isolation. In all cultures of *S. aureus* (except vaginal isolates), the most common gene was *ssp* (in 66.7 — 94.6% of cases), which was found isolated or in different combinations with other genes (*spa*, *clfA*, *clfB*). It has been established that the genetic profiles of strains of *S. aureus* isolated from bacterial carriers and patients with infectious inflammatory pathology (perinatal pyoderma, purulent wounds in diabetic foot syndrome) show a pronounced similarity in the presence of *ssp*, *spa*, *clfA* and *clfB* genes. *Conclusion.* The possible role of asymptomatic carriage of strains of *S. aureus* with a pathogenic potential in the development of endogenous infections of different localization is discussed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 56—62

Key words: *Staphylococcus aureus*, biotopes, genetic determinants of pathogenicity

ВВЕДЕНИЕ

Способность золотистых стафилококков вызывать инфекционный процесс обусловлена наличием у них широкого спектра факторов патогенности, в том числе адгезии, альтерации и иммунорезистентности, которые детерминируются определенными генами [16].

Так, гены *clfA* и *clfB* кодируют протеины клеточной стенки, ответственные за связывание фибриногена и определяющие адгезивные возможности *Staphylococcus aureus* во внутренней среде макроорганизма [15]. К факторам альтерации относятся ферменты различной субстратной специфичности, осуществляющие деградацию биологических макромолекул, в частности универсальные для бактерий сериновые протеазы [2]. У *S. aureus* выявляется сериновая протеаза V8, кодируемая геном *ssp*, которая расщепляет IgG, а также может инактивировать дефенсины нейтрофилов [7, 13]. Ген *spa* контролирует способность стафилококков синтезировать протеин А, специфици-

чески связывающий Fc-фрагменты иммуноглобулинов и обеспечивающий защиту бактерий от гуморальных факторов иммунитета.

Вместе с тем, факторами патогенности могут обладать и штаммы *S. aureus*, изолируемые от бессимптомных бактерионосителей золотистых стафилококков [7, 12, 18], что указывает на их потенциальную опасность как в плане развития эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) стафилококковой этиологии [4], так и с точки зрения возникновения экзогенных инфекций при аэрогенном распространении этих микроорганизмов, особенно среди лиц с иммунокомпрометированным статусом (новорожденные, пожилые люди и др.).

Анализ генетических детерминант патогенности у изолятов *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с ИВЗ, позволит не только охарактеризовать генетический профиль золотистых стафилококков с учетом источника их выделения, но и оценить патогенный потенциал штаммов *S. aureus* от бактерионосителей как возможных возбудителей инфекционного процесса.

Цель работы — сравнительная генетическая характеристика патогенного потенциала штаммов *S. aureus*, изолированных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 163 штаммах *S. aureus*, из них 37 штаммов выделено со слизистой оболочки переднего отдела носа у бактерионосителей (БН), 15 — из слизистого отделяемого влагалища у женщин с миомой матки (ММ), 17 — из содержимого пустул у новорожденных с перинатальной пiodермией (ПП), 15 — из трансудата венозно-трофических язв нижних конечностей (ВТЯНК), 79 — из отделяемого гнойных ран при синдроме диабетической стопы (СДС). Все культуры стафилококков изолированы в соответствии с действующими рекомендациями, а их видовую идентификацию проводили общепринятыми методами по культуральным, тинкториальным и биохимическими признакам, в том числе с помощью официальных систем «STARHytest» («Erba Lachema s.r.o.», European Union) [3, 8] и методом ПЦР с применением праймеров к 16S рНК *S. aureus*, подобранных с использованием программы PrimerSelect из пакета программ Lasergene (DNASTAR Inc, США).

Выделение тотальной ДНК стафилококков осуществляли из бактериальных суспензий ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл; эквивалентных значению 0,5 стандарта мутности МакФарланда), приготовленных на стерильной H_2O из суточных агаровых культур *S. aureus* сорбционным методом с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя.

Аmplификацию проводили с использованием стандартных наборов на многоканальном амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 1 цикл — $94^\circ C$, 5 мин; 30 циклов: $94^\circ C$, 30 сек; $55^\circ C$, 30 сек; $72^\circ C$, 30 сек; последний цикл — 2 мин при $72^\circ C$. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1,7% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием, ТАЕ буферной системе с использованием стандартных наборов фирмы «ИнтерЛабСервис». В качестве маркеров использовали маркер длины ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЕвроГен). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

Обнаружение специфических VNTR-локусов, ассоциированных с патогенностью *S. aureus* (*sra*, *ssp*, *clfA* и *clfB*), проводили с помощью постановки мультиплексной ПЦР с использованием подобранных праймеров (табл. 1). Для их подбора, а также оптимальных условий проведения анализа пользовались программой PrimerSelect из пакета программ Lasergene, в том числе — Megaline (Lasergene) (DNASTAR, Inc США), с целью выравнивания полученных сиквенсов. Данные обработаны методами вариационной статистики [6, 10].

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер продукта, п.н.
<i>clfA</i> (F)	GATTCTGACCCAGGTTTCAGA	1000—1500
<i>clfA</i> (R)	CTGTATCTGGTAATGGTTCTTT	
<i>clfB</i> (F)	ATGGTGATTACAGCAGTAAATCC	800—980
<i>clfB</i> (R)	CATTATTTGGTGGTGTAACCTCTT	
<i>sra</i>	AGCACCAAAAAGAGGAAGACAA GTTTAACGACATGTACTCCGT	200—400
<i>ssp</i>	ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	150—200

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты свидетельствовали о вариабельности частоты встречаемости изученных генов как у изолятов *S. aureus* в отдельных группах (с учетом источника их выделения), так и штаммов золотистого стафилококка во всей изученной выборке (табл. 2).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что в целом у золотистых стафилококков наиболее часто обнаруживались гены *ssp* и *sra* (77,9 и 51,5%, соответственно), при этом ген сериновой протеазы (*ssp*) чаще регистрировался у штаммов *S. aureus*, изолированных от БН и новорожденных с ПП (94,6 и 94,1% соответственно), а ген *sra*, ответственный за синтез протеина А — у культур, выделенных от новорожденных с ПП и больных с СДС — 70,6 и 68,4% соответственно. Гены *clfA* и *clfB*, детерминирующие адгезивные свойства стафилококков, у изученных штаммов встречались несколько реже: *clfA* обнаружен у 32,5% изолятов *S. aureus* с преобладанием у культур, выделенных от больных с СДС (46,8%), а ген *clfB* — у 10,7% штаммов, причем в 21,6% случаев у золотистых стафилококков, выделенных от БН, поскольку именно он определяет формирование резидентного бактерионосительства, так как кодирует протеин клеточной

Таблица 2. Распространенность изученных генов у штаммов *S. aureus*, выделенных из разных источников

Источники выделения штаммов <i>S. aureus</i>	Число штаммов	Частота встречаемости изученных генов у штаммов <i>S. aureus</i> *				
		Отсутствуют	<i>ssp</i>	<i>sra</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>
Бактерионосители	37	0	<u>35</u> 94,6	<u>15</u> 40,5	<u>11</u> 29,7	<u>8</u> 21,6
Женщины с ММ	15	<u>12</u> 80,0	<u>3</u> 20,0	<u>3</u> 20,0	0	<u>1</u> 6,7
Новорожденные с ПП	17	0	<u>16</u> 94,1	<u>12</u> 70,6	<u>4</u> 23,5	<u>3</u> 17,6
Больные с ВТЯНК	15	<u>4</u> 26,7	<u>10</u> 66,7	0	<u>1</u> 6,7	0
Больные с СДС	79	<u>6</u> 7,6	<u>61</u> 77,2	<u>54</u> 68,4	<u>37</u> 46,8	<u>5</u> 6,3
Всего	163	<u>22</u> 13,5	<u>127</u> 77,9	<u>84</u> 51,5	<u>53</u> 32,5	<u>17</u> 10,7

Примечание. * В числителе — количество штаммов с признаком (абс.); в знаменателе — доля штаммов с признаком (%).

стенки, обладающий повышенным сродством к лорикрину (белку, расположенному на поверхности клеток слизистой оболочки носовых ходов) [17].

Установлено, что исследованные генетические детерминанты, кодирующие клампинг-фактор, встречались не у всех изученных штаммов *S. aureus*, выделенных из разных источников (биотопов). Так, отсутствие гена *clfA* зарегистрировано среди культур, изолированных от женщин с ММ, а гена *clfB* среди штаммов, выделенных от больных с ВТЯНК; у этих же культур не выявлен ген *sra*.

Детальный анализ присутствия наиболее часто обнаруживаемого гена *ssp* показал, что он может выявляться у штаммов *S. aureus* как по отдельности, так и в разных комбинациях.

У изученных штаммов наиболее часто ген *ssp* регистрировался либо изолированно (у 23,9% культур), либо в сочетании с геном *sra* (у 24,6% изолятов) или комплексе из трех генов (*ssp*, *sra*, *clfA*) — в 14,7% случаев. Другие его комбинации из двух, трех и четырех генов у изолятов золотистого стафилококка встречались значительно реже (от 0,6 до 5,5%).

Что касается изолированного присутствия у культур *S. aureus* гена *ssp*, то чаще всего он фиксировался у стафилококков, выделенных от пациентов с ВТЯНК (66,6%) и БН (40,6%), тогда как среди штаммов *S. aureus*, изолированных от больных с СДС и новорожденных с ПП, частота его встречаемости была значительно ниже — 15,2 и 11,7%, соответственно, а у штаммов, выделенных от женщин с ММ, ген *ssp* не определялся.

Следует отметить, что наиболее часто регистрируемая комбинация из двух генов (*ssp*, *sra*) выявлялась преимущественно среди штаммов *S. aureus*, изолированных из пустул новорожденных с ПП, раневых дефектов у больных с СДС и носовых ходов у БН (58,9; 24,1 и 24,3% соответственно), а комплекс трех генов патогенности (*ssp*, *sra*, *clfA*) обнаруживался, главным образом, у золотистых стафилококков, выделенных из гнойных ран у больных с СДС (в 29,1% случаев).

При анализе генетических детерминант, кодирующих клампинг-фактор, было установлено наличие комплекса этих генов (*clfA* и *clfB*) среди штаммов, выделенных от больных с СДС в 2,5% случаев.

Комбинации генов *clfA* и/или *clfB* с *sra* встречались не у всех изученных штаммов *S. aureus*, выделенных из разных источников (биотопов). Так, сочетания генов *clfA* и *sra* выявлялись у 5,1% изолятов от больных с СДС и 2,7% культур от БН, *clfB* и *sra* обнаружены у 2,5% стафилококков от больных с СДС, а комбинация трех генов (*clfA*, *clfB*, *sra*) зарегистрирована у 2,7% *S. aureus*, изолированных от БН.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что изученные генетические детерминанты патогенности широко распространены среди штаммов золотистых стафилококков, выделенных как от больных людей, так и от бактерионосителей. Следовательно, *S. aureus*, вегетирующие на слизистой оболочке передних носовых ходов и обладающие патогенным потенциалом, могут стать причиной эндогенной инфекции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные результаты по детекции у 163 штаммов *S. aureus* генов, детерминирующих их адгезивную активность, способность к альтерации и иммунорезистентность, отражают особенности распространенности указанных генетических маркеров патогенности в популяциях этих бактерий, изолированных из разных биотопов тела человека, и отражают определенную зависимость частоты их присутствия у бактерий от источника выделения последних.

С использованием ПЦР установлено, что изученные генетические детерминанты вирулентности широко распространены среди штаммов *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей, что подтверждает их этиологическую роль в развитии инфекционно-воспалительной патологии, в частности гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы [9]. Эти данные согласуются с аналогичными результатами, полученными ранее [11, 14], которые указывали на то, что штаммы *S. aureus*, выделенные от бактерионосителей, характеризуются наличием генетических детерминант лейкоцидина, являющегося маркером тяжелых инфекционных процессов, а также генов, детерминирующих синтез стафилококковых энтеротоксинов.

Всеми изученными детерминантами патогенности характеризовались также штаммы от больных с СДС, причем в отличие от других изолятов, почти у половины этих стафилококков был зарегистрирован ген *clfA*, кодирующий фибриноген-связывающий белок, который, по-видимому, наряду с другими факторами, играет определенную роль в нарушении системы гемостаза у данных пациентов.

Стафилококки являются ведущими этиологическими факторами в возникновении гнойно-воспалительных процессов у новорожденных [5]. В нашем исследовании показано наличие у *S. aureus*, изолированных от новорожденных с ПП, изолированно или в различных комбинациях всех изученных генетических детерминант патогенности, что дополняет имеющиеся сведения о генетическом профиле стафилококков, выделенных при внутрибольничной вспышке инфекции и отличающихся повышенной вирулентностью, высокой частотой горизонтального переноса SCC *mec*-кассет и генов токсинов [1].

Данные о широком распространении генетических детерминант патогенности у стафилококков, выделенных от бессимптомных бактерионосителей со слизистой оболочки носовой полости, позволяют рассматривать данный биотоп как возможный и важный источник возбудителей эндогенной инфекционно-воспалительной патологии [19], что служит обоснованием проведения санационных мероприятий у этой группы лиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абаев И.В., Скрыбин Ю.П., Печерских Э.И. Генотипирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных при вспышке эксфолиативного дерматита новорожденных. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014, 1: 70-78.
2. Бондаренко В.М., Мавзютов А.Р., Агапова А.Р. Сериновые протеазы грамотрицательных бактерий: структура, механизмы секреции, биологическая активность. Журн. микробиол. 2002, 6: 80-85.
3. Донецкая Э.Г. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. М., ГЭОТАР-Медиа, 2011.
4. Дубовец К.Н. Антибактериальная терапия инфекций, вызванных *Staphylococcus aureus*. Военная медицина: научно-практический рецензируемый журнал. 2011, 3: 111-124.
5. Крамарь Л.В., Савченко Т.Н., Крамарь В.О. Факторы, способствующие персистенции стафилококков в кожном микробиоценозе новорожденных. Детские инфекции. 2011, 2: 60-62.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., Высшая школа, 1990.
7. Пикина А.П., Шкопоров А.Н., Кулагина Е.В. Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом. Вестник РАМН. 2016, 71 (5): 367-374.
8. Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

9. Трифоненко А.Е., Гульнева М.Ю. Условно-патогенные микроорганизмы в этиологии гнойно-некротических форм синдрома диабетической стопы. Вестник СПбГУ. 2013, 11 (2): 115-120.
10. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М., ГЭОТАР-Медиа, 2013.
11. Уткина Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Фенотипическая характеристика и генетические детерминанты патогенности *Staphylococcus aureus*, выделенных у бактерионосителей, проживающих на территориях с разным уровнем антропогенного загрязнения воздушной среды. Журн. микробиол. 2015, 4: 35-40.
12. Шаркова В.А. Лайман Е.Ф., Мазур М.Е. Генетически обусловленная патогенность и антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus*. Тихоокеанский медицинский журнал. 2014, 3: 46-49.
13. Burchacka E., Skoreński M., Sieńczyk M. et al. Phosphonic analogues of glutamic acid as irreversible inhibitors of *Staphylococcus aureus* endoproteinase GluC: an efficient synthesis and inhibition of the human IgG degradation. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters. 2013, 23 (5): 1412-1415.
14. Eibach D., Nagel M., Hogan B. et al. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* among Children in the Ashanti Region of Ghana. PLoS One. 2017, 12 (1): e0170320.
15. Jiang B., Yin S., You B. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes profiling of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in a burn center: A 5-year study. Microb Pathog. 2018, 114: 176-179.
16. Kane T.L., Carothers K.E., Lee S.W. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen *Staphylococcus aureus* for Vaccine and Therapeutics. Current Drug Targets. 2018, 19 (2): 111-127.
17. Novick R.P., Geisinger E. Quorum sensing in staphylococci. Annu. Rev. Genet. 2008, 42: 541-564.
18. Shaw L., Golonka E., Potempa J. et al. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. Microbiology. 2004, 150: 217-228.
19. Zanger P., Nurjadi D., Schleucher R. et al. Import and Spread of Panton-Valentine Leukocidin—Positive *Staphylococcus aureus* Through Nasal Carriage and Skin Infections in Travelers Returning From the Tropics and Subtropics. Clinical Infectious Diseases. 2011, 54 (4): 483-492.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.Л.Бурмистрова, Ю.Ю. Филиппова, А.В.Тимофеева

МИКРОБНЫЙ КОНСОРЦИУМ И ОКСИТОЦИН В СОЦИАЛЬНОМ ПОВЕДЕНИИ ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

Челябинский государственный университет

Цель. Оценить структуру микробного консорциума кишечника и уровень окситоцина в плазме крови в контексте выраженной социальной недостаточности у детей с расстройствами аутистического спектра. *Материалы и методы.* Обследованы 44 ребенка с расстройствами аутистического спектра, которые были поделены на две группы: 23 ребенка с отсутствием признаков социального контакта и 21 человек с сохраненным социальным контактом. Группу сравнения составили 39 типично развивающихся детей соответствующего пола и возраста. Структуру и количество микроорганизмов тонкого кишечника определяли с помощью специфических липидных маркеров в периферической крови методом газовой хромато-масс спектрометрии микробных маркеров. Концентрацию окситоцина оценивали в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. *Результаты.* Биохимические сигналы экологической системы — хозяин-ассоциированного микробного консорциума (липидом) и хозяина (нейропептид-окситоцин), при балансе отношений между ними — здоровье, работают в общем контексте — социализации метаорганизма, однако контекст может меняться при дисбалансе системы — болезнь (расстройства аутистического спектра), что способно привести к социальной недостаточности. *Заключение.* Исследования в данном направлении

помогут, как мы полагаем, приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе социальных дефицитов при аутизме, что позволит определить пути их коррекции.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 62—67

Ключевые слова: микробиота тонкого кишечника, окситоцин, расстройства аутистического спектра, социальный контакт

A.L.Burmistova, Yu.Yu.Filippova, A.V.Timofeeva

MICROBIAL CONSORTIUM AND OXYTOCINE IN THE SOCIAL BEHAVIOR OF CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Chelyabinsk State University, Russia

Aim. To assess the structure of the intestinal microbial consortium and the level of oxytocin in blood plasma in the context of severe social insufficiency in children with autism spectrum disorders. *Materials and methods.* 44 children with autism spectrum disorders were divided into two groups: 23 children with no signs of social contact and 21 people with preserved social contact. The comparison group was consisted of 39 typically developing children of the appropriate gender and age. The structure and quantity of microorganisms of the small intestine was determined with the help of specific lipid markers in peripheral blood by gas chromatography-mass spectrometry of microbial markers. The concentration of oxytocin was assessed in plasma by the method of ELISA. *Results.* Normally, the biochemical signals of the ecological system (the host-associated microbial consortium and the neuropeptide-oxytocin) work in the general context of the socialization of the meta-organism. However, an imbalance of the system (disease — autism spectrum disorders) can lead to change context and social insufficiency. *Conclusion.* Research in this direction will help, as we believe, to understand of the mechanisms underlying social deficits in autism, which will allow us to determine the ways of their correction.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 62—67

Key words: small intestine microbiota, oxytocin, autistic spectrum disorders, social contact

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) определяют как гетерогенную патологию нейроразвития, которая встречается с частотой примерно один случай на каждого из 68 детей, при соотношении мальчиков к девочкам 4:1. Чаще всего РАС диагностируется в первые три года, которые определяют как постнатальный критический период в развитии мозга, так как в это время происходит опыт-зависимая аранжировка нейронных окружностей. Общим свойством аутистических детей является атипичное поведение в ответ на сенсорные стимулы. Необходимо отметить, что нарушение сенсорного процессинга является наиболее распространенным симптомом у детей с РАС по отношению к другим нарушениям развития и тяжесть его коррелирует с тяжестью социальной недостаточности [8]. К сожалению, и на сегодня этиология данного заболевания не известна. Хотя во многих исследованиях подчеркивается его генетическая основа, но в равной степени в качестве факторов риска указываются условия окружения, инициирующие нарушения в программах развития мозга. РАС коморбиден со множеством других заболеваний, среди которых нарушения со стороны ЖКТ, практически всегда ассоциированные с дестабилизацией микробного сообщества кишечника, отмечаются наиболее часто. Как отмечают Dinan T.G. et al. [5], деструктурирование микробной

составляющей организма хозяина (человека) несет множество критических последствий для его физиологических процессов, включая социальное поведение и процессы познания, в различные периоды жизни и, особенно, в критические периоды — пренатальное и постнатальное развитие, подростковый возраст, старость. Таким образом, мы можем предполагать, что основные (возможно большинство) симптомы изменения социального поведения при РАС могут быть связаны с характером микробного консорциума больного ребенка и изменением процессинга сенсорной информации в различных отделах мозга. С позиций современной биологии организм человека является интегральной системой, включающей элементы хозяина — клетки и гены, являющиеся историческими продуктами ряда анцестральных симбиозов, и микросимбиозы из представителей различных доменов жизни (вирусы, археи, бактерии, грибы, простейшие, гельминты), которая носит название метаорганизм. Функции такой системы — анатомическая, физиологическая, генетическая, иммунная и развития вовлечены в формирование ассоциативного баланса отношений с множеством видов микромира на основе общих сигнальных систем, что свидетельствует о ее конгруэнтности [6, 9]. Более того, наблюдения, сделанные в последние годы, позволяют взглянуть на значимость оси метаорганизма микробиота-кишечник-мозг с новых позиций. Так, в стадии доказательств находится положение о том, что плацента человека является «гаванью» уникального низко-обогащенного микробиома, что, возможно, позволяет младенцам еще внутри матки приобретать колонистов из плаценты, и степень колонизации варьирует в течение всего периода беременности [3]. В итоге, первые критические события для нормального развития мозга — нейруляция, кортикальный нейрогенез, нейрогенез гиппокампа, формирование астроцитов и старт глиогенеза, проходят, как можно предположить, в «объятиях» плацентарного микробиома, что является еще одним подтверждением нашей конгруэнтности и нашего ко-развития [4, 6]. Итак, наш метаорганизм владеет человек-ассоциированным микробиомом, ограниченным по разнообразию таксонов, который для сохранения себя в эволюции должен обеспечить себе не только вертикальную трансмиссию, но и пролонгированную рециркуляцию среди социальных групп, что позволяет микробиому совместить свой генетический профиль с полиморфным геномом макроорганизма и, таким образом, найти нового хозяина. Такая цель достигается расширением своего разнообразия (по гено- и фенотипическим свойствам) и активацией программ специфического социального поведения среди членов человеческой популяции. В настоящее время к наиболее изученным микросимбионтам метаорганизма относится бактерiom, члены которого встали на путь социальной жизни около 3,5 млрд лет назад и успешно используют и сегодня феномен социального поведения: демонстрируют индивидуальный клеточный сенсинг и поведение также хорошо, как кооперативный информационный процессинг, включающий коллективное восприятие, анализ информации и подготовку и выпуск совместного решения, привлекая для его исполнения нейро-эндокринную систему хозяина (макроорганизма) и манипулируя его поведением [1, 2]. Рядом авторов высказана гипотеза, что трансмиссия мутуалистических микросимбионтов между макроорганизмами работает как селективная сила, иницирующая социальность и формирование социальных структур, которые определяют психобиологическую основу групповой жизни, социальное восприятие, выбор партнера и сексуальное

поведение, а также обладает потенциалом воздействия на развитие, выживаемость и репродуктивный успех индивидуумов, особенно входящих в социальную группу родственников [9, 10]. Это не удивительно, так как регуляторные сети эукариотических хозяев структурированы для осуществления функций в контексте взаимодействий с резидентной микробиотой [1, 6]. Как показало изучение приматов, наиболее значимыми в трансмиссии живых микроорганизмов между членами группы являются прямые механизмы, зависящие от физических контактов: социального груминга, взаимодействий «рот-рот-поцелуй», при котором одновременно происходит взаимный обмен микробами между партнерами и визуализация выражения лица (что, вероятно, предназначено для передачи эмоциональных состояний) и сексуальных отношений [10]. В последние годы установлено, что при взаимных контактах тел метаорганизмов происходит стимуляция продукции окситоцина — «социального гормона», участвующего в процессе формирования социальных коммуникаций у различных видов [7]. Ассоциация условных (контакт «рот-рот») и безусловных стимулов (продукция окситоцина) усиливает социальное поведение через ассоциативное обучение и, таким образом, индуцирует соответствующий ответ (в т.ч. освобождение окситоцина) даже в отсутствии спаривания [10]. Внимание исследователей к окситоцину сформировалось недавно, в связи с результатами ряда исследований о способности его к модуляциям многих аспектов социальных отношений, включая связь «родители-дети» и групповые связи. Высказано предположение, что в эволюции он выполняет чрезвычайно значимую роль в социальных контактах, включая сексуальное поведение, выражение сочувствия, доверия и групповое покровительство [7]. Более того, на сегодня не вызывает сомнений, что связь микробное сообщество-окситоцин-социальное узнавание/социальное поведение подкреплена еще одной системой — обоняние, так как бактерии, похоже, были и являются соучастниками в продукции одорантов, способных обуславливать социальное поведение [7]. Эти данные являются еще одним подтверждением, что микробиом оказывает влияние на многие аспекты социального поведения человека.

Цель работы — оценить структуру микробного консорциума кишечника и уровень окситоцина в плазме крови детей с РАС в контексте выраженной социальной недостаточности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

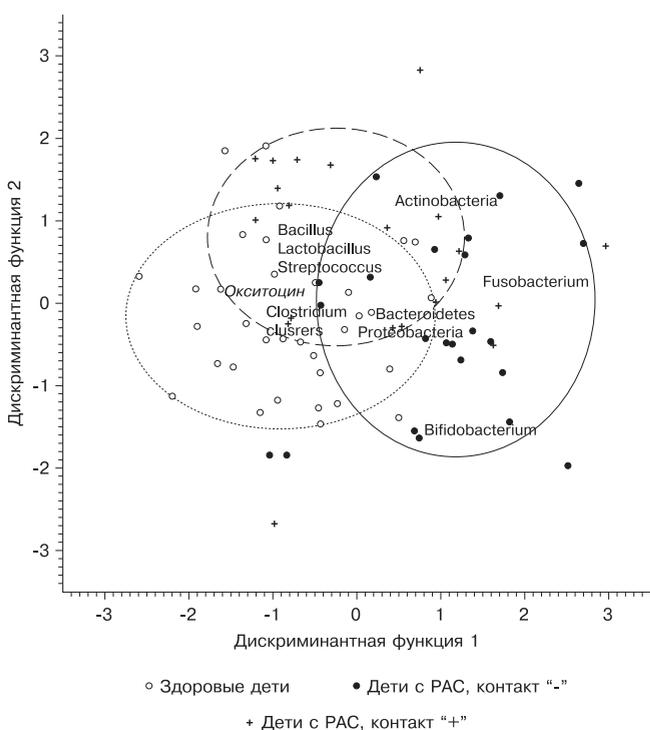
Были обследованы 44 ребенка с РАС: 37 мальчиков (84%) и 7 девочек (16%) в возрасте от 3 до 12 лет. Дети, включенные в исследование, имели диагнозы по МКБ-10: F84.0, F84.1 и F83.1. На основании клинического анамнеза, в зависимости от наличия/отсутствия социального контакта (учитывались такие признаки, как присутствие зрительного контакта, указательного жеста, узнавания матери, общение с другими детьми). Обследованные были поделены на две группы: 23 ребенка с отсутствием признаков социального контакта и 21 ребенок с сохраненным социальным контактом. Группу сравнения составили 39 типично развивающихся детей (ТРД) соответствующего пола и возраста. У всех родителей получено информированное согласие об участии. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016.).

Для изучения структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника определяли специфические химические маркеры микроор-

ганизмов (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерины) в периферической крови с помощью метода газовой хроматографии-масс спектрометрии микробных маркеров (ГХ-МСММ), предложенного Осиповым Г.А., 2009. Концентрацию окситоцина оценивали в плазме крови методом твердофазного иммуоферментного анализа наборами реагентов Peninsula Lab. International Inc. (Калифорния, США). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерий Стьюдента. Для обнаружения взаимосвязи между микробным консорциумом тонкого кишечника, окситоцином и социальным поведением детей с РАС применяли дискриминантный анализ. Все расчеты и графические построения выполнены в пакете SPSS for Windows (v. 15.0., SPSS Inc.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы нами были определены липидные маркеры более 50 видов/родов микроорганизмов, принадлежащих к пяти основным типам тонкого кишечника: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, и системные уровни окситоцина в группах ТРД и детей с РАС с наличием/отсутствием социального контакта (рис.).



Взаимосвязь микробного консорциума тонкого кишечника и окситоцина с наличием/отсутствием социального контакта у детей с РАС.

На рисунке показано расположение исследуемых показателей (структура микробиоты и системный уровень окситоцина) и обследуемых лиц в пространстве двух дискриминантных функций. Белыми точками и эллипсом с мелким пунктиром показано расположение типично развивающихся детей; черными точками и эллипсом со сплошной линией — детей с РАС с отсутствием социального контакта; звездочками и эллипсом с крупным пунктиром — детей с РАС с наличием социального контакта.

с наличием/отсутствием социального контакта (рис.). Нами обнаружено, что в тонком кишечнике детей из группы ТРД присутствовали микроорганизмы всех пяти основных типов с преобладанием бактерий типа Firmicutes, а именно Clostridium clusters и группы Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus, что согласуется с данными Zoetendal et al. (2012). Однако Wang et al. (2005) продемонстрировали, что наряду с Firmicutes основу микробиома подвздошной кишки составляют бактерии типа Bacteroidetes. В нашем исследовании представители типа Bacteroidetes присутствовали (рис), но не были доминирующими микроорганизмами, что может быть связано с особенностями используемого в работе метода исследования: специфические липидные маркеры были определены только для родов Porphyromonas spp., Prevotella spp. и вида Bacteroides fragilis. Такая

структура микробного консорциума у типично развивающихся детей поддерживалась высоким уровнем окситоцина в плазме крови (рис.).

У детей с РАС с сохраненным социальным контактом структура микробного сообщества тонкого кишечника в целом не отличалась от таковой в группе ТРД, однако количество бактерий типа *Actinobacteria* было в 1,5 раз выше по сравнению с аналогичными показателями детей из группы ТРД (рис). Концентрация окситоцина в плазме крови детей с РАС с наличием социального контакта также поддерживалась на уровне типично развивающихся детей.

Отсутствие социального контакта у детей с РАС нашло отражение в изменении структуры основных типов микроорганизмов тонкого кишечника: для детей с РАС без социализации были характерны значимо высокое количество бактерий типов *Actinobacteria* (включая *Bifidobacterium*) и *Fusobacteria* в сравнении с показателями детей из группы ТРД. Кроме того, у детей с РАС без социализации наблюдался достоверно низкий уровень окситоцина в плазме крови.

Таким образом, анализ композиции микробного сообщества тонкого кишечника на основе его липидного профиля и определение уровня «социального гормона» окситоцина в плазме крови детей с РАС с наличием/отсутствием сигналов социальной недостаточности позволяет сделать следующее предположение: биохимические сигналы экологической системы — хозяин-ассоциированного микробного консорциума (липидом) и хозяина (нейропептид-окситоцин), при балансе отношений между ними — здоровье, работают в общем контексте — социализации метаорганизма [6]. Однако контекст может меняться при дисбалансе экологической системы — болезнь (РАС), что способно привести к социальной недостаточности. Исследования в данном направлении помогут, как мы полагаем, приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе социальных дефицитов при РАС, что позволит определить пути их коррекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурмистрова А.Л. Иммуный гомеостаз и микросимбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний кишечника. Челябинск: Челябинский дом печати, 1997.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
3. Aagaard K., Ma J., Antony K.M. et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 2014, 6 (237): 237ra65.
4. Borre Y.E., O’Keeffe G.W., Clarke G. et al. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol. Med.* 2014, 20(9): 509-518.
5. Dinan T.G., Stilling R.M., Stanton C. et al. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. *J. Psychiatr. Res.* 2015, 63:1-9.
6. Gilbert S.F., Sapp J., Tauber A.I. A symbiotic view of life: we have never been individuals. *Q Rev Biol.* 2012, 87 (4): 325-341.
7. Insel T.R. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron.* 2010, 65 (6): 768-779.
8. LeBlanc J.J., Fagiolini M. Autism: a «critical period» disorder? *Neural plasticity.* 2011; 2011, Article ID 921680.
9. Lombardo M.P. Access to mutualistic endosymbiotic microbes: an underappreciated benefit of group living. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2008, 62: 479-497.
10. Montiel-Castro A.J., González-Cervantes R.M., Bravo-Ruiseco G. et al. The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Front. Integr. Neurosci.* 2013, 7: 70.

Ю.К.Кулаков

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Бруцеллез — инфекционное, особо опасное зоонозное заболевание сельскохозяйственных и диких животных, от которых передается человеку и характеризуется хроническим течением с инвалидизацией больных трудоспособного возраста. Бактерии рода *Brucella* — факультативные внутриклеточные патогены, способные размножаться и персистировать в иммунных клетках хозяина с развитием хронической инфекции. Хозяйско-специфичные эволюционные механизмы позволяют бруцеллам скрываться и манипулировать системами врожденного и приобретенного клеточного иммунитета для достижения внутриклеточной персистенции. В обзоре показаны молекулярные механизмы, обеспечивающие персистенцию возбудителя бруцеллеза. Эволюция бруцелл связана с адаптацией внутриклеточного сохранения и персистенции в сформированных гранулематозных структурах. Понимание молекулярных механизмов персистенции возбудителя бруцеллеза следует учитывать в программах по его контролю и элиминации и позволяет разрабатывать новые эффективные средства для профилактики и лечения бруцеллеза.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 68—76

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella*, персистенция, врожденный и приобретенный иммунитет, эволюция

Yu.K.Kulakov

MOLECULAR MECHANISMS OF *BRUCELLA* PERSISTENCE

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Brucellosis is an infectious, especially dangerous zoonotic disease of agricultural and wild animals, from which it is transmitted to humans and characterized by a chronic course with disability of working-age patients. Bacteria of the genus *Brucella* are facultative intracellular pathogens capable of multiplying and persisting in the host's immune cells with the development of chronic infection. The host-specific evolutionary mechanisms allow *Brucella* to hide and manipulate the systems of innate and acquired cellular immunity to achieve intracellular persistence. The review describes the molecular mechanisms that ensure the persistence of the causative agent of brucellosis. The evolution of *Brucella* species is associated with the adaptation of intracellular preservation and persistence in the formed granulomatous structures. Understanding the molecular mechanisms of *Brucella* persistence should be considered in programs for its control and elimination, and also allows the development of new effective tools for the prevention and treatment of brucellosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 68—76

Key words: brucellosis, *Brucella*, persistence, innate and adaptive immunity, evolution

Бруцеллез — инфекционное, особо опасное зоонозное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, которые являются грамотрицательными, факультативными бактериями со способностями к внутриклеточному паразитированию и трансмиссивной передачей от животных к человеку [9, 25, 40].

Бруцеллез представляет актуальную проблему для здравоохранения во всем мире. По данным ВОЗ в мире ежегодно регистрируется более 500 тыс. впервые выявленных случаев бруцеллеза у людей [25], для России этот показатель составляет около 400 человек [42]. Бруцеллез у людей протекает с рецидивами и переходит в хроническую форму, устойчивую к терапии антибиотиками [2, 5, 6, 9, 43].

Наиболее патогенным для человека является вид *B. melitensis* (основной хозяин — мелкий рогатый скот), затем следуют *B. suis* (свиньи, зайцы, олени, грызуны), *B. abortus* (крупный рогатый скот) и вид *B. canis* (собаки), опасный для иммунодефицитных людей [9, 25, 40].

Бруцеллез характеризуется вариабельным инкубационным периодом и заболеванием с тяжелыми клиническими проявлениями, которое требует значительных ресурсов для длительного лечения [6, 9, 42]. Бруцелла демонстрирует выраженный тканевый тропизм и обладает способностью размножаться и персистировать внутри вакуолей макрофагов, дендритных клеток, плацентарных трофобластов и в разнообразных типах клеток млекопитающих: микроглиях, фибробластах, эпителиальных и эндотелиальных клетках [2, 5, 6, 9, 20, 43].

Внутри клеток *Brucella* ограничивает воздействие хозяйских врожденных и адаптивных иммунных ответов, укрывается от воздействия антибиотиков и вызывает фазовые особенности протекания. Выделяют острую фазу, в течение которой наблюдается бактериемия и патоген проникает и распространяется в тканях хозяина, и хроническую фазу инфекции, которая возникает из способности бруцелл сохраняться и персистировать в клетках лимфоретикулярной системы и вызывать сердечнососудистую, печеночную, лимфоретикулярную, неврологическую и остеоартикулярную патологию [2, 5, 6, 9, 20, 43]. Отличительной чертой бруцеллеза является образование гранулем в пораженных органах, которые содержат эпителиоидные макрофаги, сохраняющие бруцелл во время инфекции [40]. Гранулематозный ответ хозяина позволяет изолировать бактерии, которые были захвачены макрофагами, но остались жизнеспособными [5, 6, 9, 20, 40].

Бруцеллы преодолевают мукозный барьер слизистых оболочек хозяина и подвергаются фагоцитозу макрофагами и дендритными клетками [43], что требует набора нитей актина после активации при взаимодействии их с рецепторами на поверхности клеточной мембраны макрофагов. Опсонизированные бруцеллы интернализируются с помощью рецепторов комплемента, тогда как не опсонизированные бактерии взаимодействуют с лектиновыми и фибронектиновыми рецепторами [43]. Не опсонизированные бруцеллы могут выживать и размножаться внутри клетки, в отличие от этого опсонизация бактерий или IFN γ активация макрофагов способствует внутриклеточному уничтожению бруцелл внутри клетки-хозяина [43]. Липидные плоты содержат богатые холестерином микродомены в клеточной мембране макрофагов, участвуют в бактериальной интернализации и способствуют направленному внутриклеточному передвижению бруцелл [2, 43].

После интернализации бруцелл образуется содержащая бруцелл вакуоль — BCV. Около 90% фагоцитированных бруцелл разрушаются под бактерицидным воздействием свободных радикалов кислорода, оксида азота и ферментов внутри фаголизосом. Остальные бактерии преодолевают эти бактерицидные факторы, взаимодействуют с ранней и поздней эндосомой и после временного короткого процесса слияния с лизосомой могут активно исключать лизосомальные белки и перенаправить BCV в ЭР (эндоплазматический ретикулум), где проис-

ходит размножение бруцелл [1, 26]. Подкисление BCV не повреждает бактерии, но это вызывает экспрессию бактериальных генов, которые необходимы для внутриклеточного выживания на ранних стадиях инфекции [2, 3, 22].

Таким образом, для продолжения внутриклеточного размножения и персистенции *Bruceella* проходит ряд превращений вакуоли. С начальной эндоцитарной eBCV формируется в репликативную вакуоль rBCV, которая завершается специализированной структурой — аутофагической aBCV. При этом связанные с аутофагией белки хозяина BECLIN1, PI3K, ULK1 и Atg14L играют ключевую роль в биогенезе этой вакуоли и способствуют завершению внутриклеточного жизненного цикла с выходом бруцелл из клеток для последующей диссеминации в организме хозяина [36, 37].

Перечисленные особенности фагоцитоза создают условия для персистенции бруцелл в макроорганизме хозяина.

Врожденная иммунная система считается первой линией защиты от патогенов. Хозяин имеет механизмы для обнаружения присутствия бактерий через врожденную систему иммунного надзора. Рецепторы, присутствующие в клеточных мембранах (TLR) или в цитозоле (NLR) способны обнаруживать структуры, считающиеся уникальными для бактерий: ЛПС, липотейхоевые кислоты, липопотеины и флагеллин, что приводит к индукции начального провоспалительного ответа. Бруцеллы имеют пассивные и активные молекулярные механизмы для ускользания от обнаружения врожденной иммунной системой с участием TLR и NLR .

В структуре ЛПС бруцеллы имеют особенности липида А, который содержит большой остаток жирных кислот (C28) по сравнению с ЛПС энтеробактерий (C12-C16), и эта модификация значительно снижает активность его взаимодействия с рецептором TLR4 и позволяет уклоняться от распознавания сигнальными путями через рецептор TLR4 [3, 12]. Активность агониста TLR4 дополнительно снижается путем гликозилирования ядра ЛПС, что снижает его сродство к рецептору TLR4 MD-2 [8, 45].

Bruceella также синтезирует модифицированный флагеллин, который не индуцирует TLR5-доменного рецептора для узнавания в иммунных клетках и проведения опосредованных воспалительных реакций [12, 39].

Пути активации комплемента и бактериальных конкретных TLRs действуют совместно и помогают макроорганизму организовывать соответствующий угрозе иммунный ответ (приток нейтрофилов и др.) [46]. Активация системы комплемента включается при контакте с поверхностными бактериальными углеводами ЛПС из грамотрицательных бактерий [3, 12, 17]. ЛПС бруцелл содержит O-полисахарид из гомополимерных остатков, которые не обеспечивают полного связывания C3 системы комплемента и останавливают выработку поколения противовоспалительных продуктов системы комплемента C3a и C5a [3, 12, 17].

Важным событием при бруцеллезе становится ингибирование нейтрофильной функции хозяина, что свидетельствует о дополнительной роли ЛПС *B. abortus* в уклонении от врожденного иммунитета. Как только бруцеллы фагоцитируются нейтрофилами, происходит высвобождение ЛПС в вакуоль и в патогенезе это событие вызывает форму невоспалительной гибели клеток, тем самым сохраняется жизнеспособность поглощенных бактерий [4].

Хотя бруцеллы являются неподвижными бактериями, их геномы кодируют структурные компоненты нетрадиционного флагеллина (жгутика) неизвестной функции, который способен избегать обнаружения TLR5, в связи с отсутствием необходимого домена для его распознавания этим рецептором

[2, 12, 22]. Но было показано, что цитозольный рецептор NLCR4 способен обнаруживать флагеллин *Brucella* и важен для контролирования инфекции *in vivo* [39].

В дополнение к TLR4, TLR2 и сигнальный путь через TLR9 участвует в определении бруцеллезной инфекции [21].

Молекулярным механизмом для активного вмешательства в иммунное распознавание бруцелл является синтез белков, которые содержат TIR домен — Vtp1 / VtpA у *B. abortus* и TspB у *B. melitensis* [32, 33].

Vtp1 и TspB негативно воздействуют на проводящую функцию адаптера MyD88 (MAL), который требуется для сигнализации TLR2 и TLR4 [32, 33]. В результате эти белки ингибируют созревание дендритных клеток и продукцию провоспалительных цитокинов, что способствует долгосрочному сохранению и персистенции бруцелл.

Недавно был описан второй эффекторный белок с доменом TIR, названный VtpB [31]. VtpB вмешивается в сигнализацию TLR зависимым MyD88 образом, но его роль в модулировании воспалительных реакций и бактериальной персистенции окончательно не определена.

Таким образом, бруцеллы способны скрывать важные для распознавания молекулярные структуры, которые позволили бы хозяину их обнаружить через TLR и систему комплемента, что предотвращает индукцию соответствующего антибактериального иммунного ответа и значительно ухудшает инфекционный контроль хозяина.

Все виды *Brucella* располагают важным фактором вирулентности для внутриклеточной выживаемости и персистенции T4SS (type IV secretion system), которая кодируется генами virB1-virB12 [12, 13, 24].

Критическая роль T4SS в персистенции определилась в неспособности virB мутантов к внутриклеточному размножению *in vivo* на мышшиной [14, 18] и козьей моделях инфекций [47]. Также T4SS участвует в создании ассоциированной с ЭР специализированной репликативной ниши для бруцелл [7], при этом virB мутанты деградируются внутри лизосом макрофагов [2, 7].

T4SS формирует трансмембранную белковую «пушку», которая реализует транслокацию в цитоплазму хозяйской клетки белковых эффекторных молекул, за счет которых обеспечивается многообразие их функций и воздействий на развитие и поддержание внутриклеточной инфекции.

Многочисленные работы определили несколько десятков эффекторных белков T4SS бруцелл при транслокации их в цитоплазму хозяина [10, 11, 19, 23]. Функция большинства этих белков до настоящего времени неизвестна, но последние исследования доказали прямую и опосредованную роль ряда секретруемых эффекторных белков для бруцеллезной инфекции и персистенции [2, 5, 6, 10, 11, 19, 20, 23].

Эффекторный белок VseC обуславливал индукцию воспаления, влияя на выработку цитокина IL-6 в макрофагах *in vitro* путем воздействия на активацию IRE-1 α -зависимого сигнального пути при ответе на неправильную сборку белков, происходящую в ЭР [10].

Недавно было доказано, что белки VtpA (Vtp1/TspB) принадлежат к классу бактериальных белков с долей гомологии с эукариотическим Toll/интерлейкин-1 рецептором — TIR доменом [21, 32] и секретируются при проникновении бруцелл в клетки-хозяина [19]. Консервативный домен TIR присутствует в эукариотических белках TLR и в цитозольном адаптерном белке MAL (MyD88), которые играют важную роль в иммунной сигнализации. Эти эффекторные белки бруцелл вызывают деградацию сигнального проводяще-

го адаптерного белка MAL, в результате которой ингибируются TLR2 и TLR4 сигнализации и активация транскрипционного фактора NF- κ B. В результате снижается выработка важных провоспалительных цитокинов TNF alpha и IL-12 с задержкой созревания и активации дендритных клеток, что обеспечивает условия для развития инфекции и персистенции [40, 41].

Другие T4SS секретируемые, идентифицируемые белки бруцелл, BSPA, BSPB и BSPF необходимы для развития инфекции *in vivo* и влияют на синтез белков в инфицированных клетках [23].

Факторы вирулентности патогенов определяют сигналы, которые позволяют врожденной иммунной системе различать среди бактерий патогенные для организма [5].

Важно отметить двойственную роль T4SS при инфекции, в связи с множеством бактериальных эффекторных молекул, транспортирующихся в клетку-хозяина, не только для установления длительной персистентной инфекции, но и для индукции иммунного ответа Th1 (Т-хелперы 1) *in vivo* [28]. Функционирование T4SS необходимо для созревания В-клеток, активации CD4 + Т-клеток и для начальной секреции IL-12 и IFN gamma [29, 30]. Было показано, что от T4SS эффекторных молекул зависит обнаружение Nod-подобными рецепторами (NLR) [16], что приводит к опосредованной активации каспазы 1 с образованием инфламмосомы и формированием защитного хозяйского ответа.

Между иммунной системой хозяина и структурами бруцелл происходят сигнальные взаимодействия, которые могут приводить к ликвидации возбудителя или к развитию внутриклеточного персистирования.

В защите хозяина от инфекции патогенными видами бруцелл определяющую роль играет клеточно-опосредованный иммунитет — профессиональных антиген презентующих фагоцитов с Th1 поляризацией иммунного ответа и активацией CD8+ Т цитотоксических лимфоцитов (CTL) [27, 28].

Цитокины являются ключевыми эффекторными молекулами, которые организуют иммунный ответ хозяина.

Было обнаружено, что высокий уровень провоспалительных цитокинов TGF β 1 и IL-10 способствуют персистенции и хронической инфекции [15, 35, 38], а защитный иммунитет против *B. abortus* напрямую связан с индукцией провоспалительных цитокинов в ответе по Th1 [5, 6, 34].

Поэтому для персистенции и хронического протекания инфекции бруцеллы стремятся избежать защитного ответа типа Th1 [27, 34, 35]. Было показано, что пропил-рацемеза *B. abortus* PrpA стимулирует митогенную активность В-клеток и стимулирует секрецию IL-10 во время инфекции [35], при этом PrpA ассоциируется с пониженной регуляцией INF gamma и TNF alpha и повышенной регуляцией TGF β 1 *in vivo*.

Это событие уменьшает защитный провоспалительный ответ по отношению к провоспалительной иммунной реакции, в этой связи, мутант *prpA* имеет значительно сниженную способность к установлению хронической инфекции [34, 35].

IL-10 считается супрессорным фактором, и его относят к противовоспалительным иммунорегуляторным цитокинам, которые продуцируют различные типы клеток [6] и способны функционировать на разных стадиях иммунного ответа с решающей ролью регулятора реакций Th1 и Th2 [44].

Необходимым механизмом для персистентного патогена представляется индукция цитокина, способного модулировать провоспалительный ответ хозяина. Действительно, в дополнение к раннему провоспалительному от-

вету Th1 *B. abortus* во время инфекции также индуцирует противовоспалительный цитокин IL-10 [5, 6, 38, 44], который ослабляет антибруцеллезную активность активированных IFN γ макрофагов и провоспалительных цитокинов.

Эксперименты *in vivo* показали, что продуцирование IL-10 с помощью CD4 + CD25 + Т-клеток является ключом к модуляции функции макрофагов во время инфекции бруцелл. Мыши, лишенные продуцирования IL-10 Т-клетками или не обладающие рецептором к этому цитокину, показывают снижение выживаемости бактерий в селезенке и печени, а также увеличение производства провоспалительных цитокинов и патологию в пораженных органах [44].

В совокупности эти данные указывают на важную роль IL-10 в модуляции исходного иммунного ответа при бруцеллезной инфекции посредством регуляции функции макрофагов, что приводит к увеличению долговременной внутриклеточной выживаемости и персистенции бруцелл.

Наиболее родственные филогенетически бруцеллам виды *Ochrobactrum anthropi* и *O. intermedium* являются почвенными бактериями, которые могут вызывать только оппортунистические инфекции в иммунодефицитных хозяевах и не способны к внутриклеточному размножению. Эволюции генома *Ochrobactrum* со способностями внутриклеточного патогена — бруцеллы способствовали изменения его генома за счет редукции.

При этом конкретные события привели к эволюции их способности размножаться и персистировать в животных клетках. В Alpha-proteobacteria эволюция новых видов связана с уменьшением генома, и типичный геном *Brucella* (3,3 Мб), по меньшей мере, на 30% меньше, чем у *Ochrobactrum* (4,77 Мб). Дальнейшие доказательства уменьшения генома выявились при анализе белковых семейств геномов [41].

Эволюция бруцелл на пути вирулентности и адаптации к внутриклеточной жизни в эукариотических хозяевах также потребовала приобретения новых генов, которые не обнаружены в *Ochrobactrum*. Геном видов *Brucella* имеет 170 генов, которые не найдены ни в одном из двух геномов *Ochrobactrum*, и еще 249 генов, которые являются уникальными для классических штаммов [41].

Многие из этих генов обнаружены на геномных островах, участвуют во внутриклеточном размножении и персистенции и позволяют бактерии получать от хозяина ионы металлов — железо, никель и магний, которые являются важными кофакторами для многих ферментов патогена [5, 41].

Анализ геномов разных видов бруцелл выявил определенные ключевые, важные этапы в формировании внутриклеточного патогенного потенциала, необходимого для персистенции. Основным этапом было приобретение посредством горизонтального переноса, ключевого фактора вирулентности T4SS, что позволило видам *Brucella* адаптироваться к формированию патогенной ниши в ЭР. Адаптация сопровождалась вовлечением генов, кодирующих важные системы для использования ионов металлов, которые необходимы бруцеллам для выживания в хозяйских клетках.

Второй и третий этапы способствовали развитию способности бруцелл ускользать и модулировать иммунную систему хозяина. Эти свойства предусматривались изменением в структуре основного компонента ЛПС — *pegosamine* в структуре О-антигена, который связан с внутриклеточным размножением бруцелл, а также использование белков с доменами TIR, которые модулируют сигнальные пути иммунитета в становлении активных молекулярных механизмов, обеспечивающих персистенцию патогена.

Таким образом, возбудитель бруцеллеза как представитель Alphaproteobacteria вызывает не острую и смертельную инфекцию у хозяина, а хроническую инфекцию, обусловленную персистенцией возбудителя, являющейся ключевым фактором его эволюции.

Внутриклеточная биология развития бруцелл является результатом масштабного и комплексного взаимодействия с их хозяевами, что является необходимым условием для их внутриклеточного выживания, размножения с последующими явлениями диссиминации в органы и устойчивым продолжительным персистированием в сформированных гранулематозных структурах.

Бруцеллы успешно справляются с разными видами стресса внутри клетки (кислая среда и недостаток питательных веществ), которые являются стимулами для индукции генов, необходимых для изменения внутриклеточной среды. Выживаемость внутриклеточной бруцеллы сохраняется после временного слияния BCV с лизосомой и ассоциирования с ЭР, в котором происходит их внутриклеточное размножение [1] и где *Brucella* становится практически незаметной для иммунной системы [3, 5, 43], о чем свидетельствует низкая продукция цитокинов и антител во время хронической фазы инфекции [22, 27]. Таким образом, первоначальный иммунный ответ хозяина не становится ключевым фактором для контроля над внутриклеточным развитием бруцелл и позволяет им обеспечить условия для последующей персистенции.

Бруцеллы используют скрытую стратегию незаметного проникновения в клетки хозяина без полномасштабной воспалительной реакции на начальных стадиях инфекции с супрессией системы врожденного иммунитета хозяина. Хроническое течение бруцеллезной инфекции связано со способностью бруцелл как уклоняться, так и напрямую воздействовать на систему врожденного иммунитета хозяина и с созданием оптимальных условий взаимодействия с макроорганизмом для внутриклеточного размножения и персистенции [3, 5, 6, 11, 12].

До настоящего времени профилактические и терапевтические мероприятия при хроническом бруцеллезе людей являются дорогостоящими и неэффективными, в этой ситуации правильное понимание молекулярных механизмов, ответственных за персистенцию бактериального патогена, будет иметь решающее значение для разработки инновационных средств контроля, профилактики и лечения этой инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson T.D., Cheville N.F. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus* infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am. J. Pathol.* 1986, 124:226-237.
2. Atluri V.L., Xavier M.N., de Jong M.F. et al. Interactions of the human Pathogenic *Brucella* Species with Their Hosts. *Ann. Rev. Microb.* 2011, 65:523-541.
3. Barquero-Calvo E., Chaves-Olarte E., Weiss D.S. et al. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE.* 2007, 2:e631.
4. Barquero-Calvo E., Mora-Cartin R., Arce-Gorvel V. et al. *Brucella abortus* induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide. *PLoS Pathog.* 2015, 11:e1004853.
5. Byndloss M.X., Tsolis R.M. *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Ann. Rev. Anim. Biosci.* 2016, 4:111-127.
6. Byndloss M.X., Tsolis R.M. Chronic Bacterial Pathogens: Mechanisms of persistence. *Microbiol Spectr.* 2016, 4 (2).

7. Celli J., de Chastellier C., Franchini D.M. et al. Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 2003, 198:545-556.
8. Conde-Alvarez R., Arce-Gorvel V., Iriarte M. et al. The lipopolysaccharide core of Brucella abortus acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS Pathog.* 2012, 8:e1002675.
9. Corbel M.J. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 1997, 3:213-221.
10. de Jong M.F., Starr T., Winter M.G. et al. Sensing of bacterial type IV secretion via the unfolded protein response. *mBio.* 2013, 4:e00418-12.
11. De Jong M.F., Tsolis R.M. Brucellosis and type IV secretion. *Future Microbiol.* 2012, 7(1): 47-58.
12. De Jong M.F., Rolan H.G., Tsolis R.M. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: Brucella. *Cell Microbiol.* 2010, 12(9): 1195-1202.
13. Delrue R.M., Martinez-Lorenzo M., Lestrade P. et al. Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol.* 2001, 3:487-497.
14. den Hartigh A.B., Rolan H.G., de Jong M.F., Tsolis R.M. VirB3-VirB6 and VirB8-VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of Brucella in the reticuloendothelial system. *J. Bacteriol.* 2008, 190: 4427-4436.
15. Fernandes D.M., Baldwin C.L. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. *Infection and Immunity.* 1995, 63:1130-1133.
16. Gomes M.T., Campos P.C., Oliveira F.S. et al. Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to Brucella abortus infection. *J. Immunol.* 2013, 190:3629-3638.
17. Hoffmann E.M, Houle J.J. Failure of Brucella abortus lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative to activate the alternative pathway of complement. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1983, 5:65-76.
18. Hong P.C., Tsolis R.M., Ficht T.A. Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice. *Infect. Immun.* 2000, 68:4102-4107.
19. Ke Y., Wang Y., Li W., Chen Z. Type IV secretion system of Brucella spp. and its effectors. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2015, 13, 5:72.
20. Kulakov Y. K. Molecular aspects of Brucella persistence. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* 2016, 1:1-8.
21. Macedo G.C., Magnani D.M., Carvalho N.B. et al. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control Brucella abortus infection. *J. Immunol.* 2008;180:1080-1087.
22. Martirosyan A., Moreno E., Gorvel J.P. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular Brucella pathogen. *Immunological Reviews.* 2011, 240:211-234.
23. Myeni S., Child R., Ng T.W. et al. 2013. Brucella modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLOS Pathog.* 9:e1003556.
24. O'Callaghan D., Cazeveille C., Allardet-Servent A. et al. A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis. *Mol. Microbiol.* 1999, 33:1210-1220.
25. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N. et al. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006, 6:91-99.
26. Pizarro-Cerda J., Meresse S., Parton R.G. et al. Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 1998, 66:5711-5724.
27. Rodriguez-Zapata M., Matias M.J., Prieto A. et al. Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function. *Infect. Immun.* 2010, 78:3272-3279.
28. Rolón H.G., Tsolis R.M. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to Brucella abortus infection. *Infect. Immun.* 2008, 76:3207-3213.
29. Rolan H.G., Tsolis R.M. Mice lacking components of adaptive immunity show increased Brucella abortus virB mutant colonization. *Infect. Immun.* 2007, 75:2965-2973.
30. Roux C.M., Rolan H.G., Santos R.L. et al. Brucella requires a functional type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell Microbiol.* 2007, 9:1851-1869.
31. Salcedo S.P., Marchesini M.I., Degos C. et al. BtpB, a novel Brucella TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013,3:28.

32. Salcedo S.P., Marchesini M.I., Lelouard H. et al. Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog.* 2008, 4:e21.
33. Sengupta D., Koblansky A., Gaines J. et al. Subversion of innate immune responses by Brucella through the targeted degradation of the TLR signaling adapter, MAL. *J. Immunol.* 2010, 184:956-964.
34. Spera J. M., Comerci D. J., Ugalde J. E. Brucella alters the immune response in a prpA-dependent manner. *Microb. Pathog.* 2014, 0: 8-13.
35. Spera J.M., Ugalde J.E., Mucci J. et al. A B lymphocyte mitogen is a Brucella abortus virulence factor required for persistent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006, 103:16514-16519.
36. Starr T., Ng T.W., Wehrly T.D. et al. Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic.* 2008, 9:678-694.
37. Starr T., Child R., Wehrly T.D. et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. *Cell Host Microbe.* 2012, 11: 33-45.
38. Svetic A., Jian Y.C., Lu P. et al. Brucella abortus induces a novel cytokine gene expression pattern characterized by elevated IL-10 and IFN- γ in CD4+ T cells. *Int. Immunol.* 1993; 5:877-883.
39. Terwagne M., Ferooz J., Rolan H.G. et al. Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of Brucella. *Cell Microbiol.* 2013, 15:942-960.
40. Vershilova P.A., Chernisheva M.I., Knyazeva E.N. Pathogenesis and immunology of brucellosis. 1974, Moscow, Meditsina.
41. Wattam A.R., Foster J.T., Mane S.P. et al. Comparative phylogenomics and evolution of the Brucellae reveal a path to virulence. *J. Bacteriol.* 2014, 196(5): 920-930.
42. Wolfram J.H., Butaev M.K., Dyuyshev A. et al. Epidemiology chapter. *Vaccine.* 2010, 28 Suppl 5:F77-84.
43. Xavier M.N., Paxro T.A., den Hartigh A.B. et al. Pathogenesis of Brucella spp. *The Open Vet. Sci. J.* 2010, 4:109-118.
44. Xavier M.N., Winter M.G., Spees A.M. et al. CD4+ T cell-derived IL-10 promotes Brucella abortus persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog.* 2013, 9: e1003454.
45. Yang J., Zhao Y., Shao F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2015, 32:78-83.
46. Zhang X., Kimura Y., Fang C. et al. Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood.* 2007, 110:228-236.
47. Zygmunt M.S., Hagius S.D., Walker J.V., Elzer P.H. Identification of Brucella melitensis 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. *Microbes Infect.* 2006, 8:2849-2854.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Т.Н. Рыбалкина¹, Н.В. Каражас¹, П.А. Савинков^{1,2}, Р.Е. Бошьян^{1,3}, М.Ю. Лысенкова¹, М.Н. Корниенко¹, Е.М. Бурмистров¹, П.А. Веселовский¹, И.А. Солдатова²

ЗАВИСИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ МАРКЕРОВ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ ОТ ПРИВЕРЖЕННОСТИ АРВТ У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫМИ МАТЕРЯМИ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва; ²Инфекционная клиническая больница №2 Департамента здравоохранения города Москвы; ³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Цель. Изучить зависимость выявления маркеров оппортунистических инфекций (ОИ) от приверженности АРВТ у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, на примере герпесвирусных инфекций (ГВИ) и пневмоцистоза. *Материалы и методы.* Были исследованы образцы биологического материала (сыворотки крови и клетки крови) от 66 детей с ВИЧ-инфекцией в возрасте от 1 месяца до 15 лет, находившихся на лечении в Детском боксированном отделении ИКБ №2, с диагнозами «неокончательный тест на ВИЧ» и «ВИЧ-инфекция». Для определения IgM и IgG к герпесвирусам и пневмоцисте был использован метод иммуноферментного анализа; непрямая реакция

иммунофлюоресценции для выявления в клетках крови герпесвирусов и их антигенов. Ранние антигены и репродукцию вирусов определяли быстрым культуральным методом. *Результаты.* Антиретровирусную терапию в полном объеме получили 56,0% обследуемых детей, в неполном — 16,7%, у 27,3% детей приверженность к АРВТ отсутствовала полностью. Несмотря на то, что 100% детей с неокончательным диагнозом ВИЧ-инфекции были охвачены АРВТ за счёт приёма химиопрепаратов их матерями на протяжении беременности, у них всё же определяли маркеры как активных, так и латентных форм ГВИ и пневмоцистоза. У детей с подтвержденной ВИЧ-инфекцией, проживающих как в социальных учреждениях, так и в семьях, маркеры оппортунистических инфекций чаще диагностировали у пациентов, получавших АРВТ в полном и не в полном объеме, чем у детей, которым она не проводилась. *Заключение.* Выявление маркеров активных форм герпесвирусных инфекций и пневмоцистоза у ВИЧ-положительных детей, не получающих АРВТ, является основанием для её незамедлительного назначения.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 76—81

Ключевые слова: приверженность АРВТ, ВИЧ-инфекция, оппортунистические инфекции, герпесвирусные инфекции, пневмоцистоз, маркеры активной инфекции, латентная инфекция

T.N. Rybalkina¹, N.V. Karazhas¹, P.A. Savinkov^{1,2}, R.E. Boshyan^{1,3}, M.Yu. Lysenkova¹, M.N. Kornienko¹, E.M. Burmistrov¹, P.A. Veselovsky¹, I.A. Soldatova²

DEPENDENCE OF DETECTION OF MARKERS OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS FROM ADHERENCE TO ANTIRETROVIRAL THERAPY IN CHILDREN BORN BY HIV-INFECTED MATTERS

¹Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow; ²Infectious Clinical Hospital No. 2, Moscow; ³Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. To study the dependence of detection of markers of opportunistic infections from adherence to antiretroviral therapy in children born to HIV-infected mothers on the example of herpesvirus infections and pneumocystis. *Materials and methods.* Samples of biological materials (blood serum and blood cells) of 66 children with HIV infection aged 1 month to 15 years old were treated in Children's Boxed Department of Children's Hospital No. 2 with diagnoses «incomplete HIV test» (children from the age of one month to one and a half years) and «HIV infection». To determine IgM and IgG to herpesviruses and pneumocyst, the method of enzyme immunoassay was used; indirect immunofluorescence reaction for the detection of herpesviruses and their antigens in the blood, early antigens and virus reproduction were determined using a rapid culture method. *Results.* 56.0% of the surveyed children received complete antiretroviral therapy, in 16.7% of cases they were not complete, and 27.3% of children did not fully adhere to ARVT. Despite the fact that 100% of children with an incomplete diagnosis of HIV infection were covered by ARVT due to the use of chemotherapy drugs by their mothers during pregnancy, they still had markers of both active and latent forms of herpesvirus infections and pneumocystis. In children with confirmed HIV infection living both in social institutions and in families, the markers of opportunistic infections were more often diagnosed in patients receiving ARVT in full and not in full volume than in children who did not have it. *Conclusion.* Identification of markers of active forms of herpesvirus infections and pneumocystis in HIV-positive children not receiving ARV is the basis for its immediate appointment.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 76—81

Key words: adherence to ARVT, HIV infection, opportunistic infections, herpesvirus infections, pneumocystis, active infection markers, latent infection

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации отмечается ежегодный рост заболеваемости ВИЧ-инфекцией. По данным Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИД в 2015 г. среди впервые выявленных ВИЧ-положительных преобладали россияне в возрасте 30-40 лет (48%). Вторую ступень занимала возрастная группа 20-30 лет (26%) и третью — 40-50 лет (18%). Поэтому в настоящее время на первое место выходит вопрос приверженности антиретровирусной терапии (АРВТ) как фактора, способного остановить репродукцию вируса в организме, восстановить иммунную систему, а также увеличить продолжительность и улучшить качество жизни ВИЧ-инфицированных больных. В научной терминологии под понятием «приверженность лечению» подразумевают, насколько ВИЧ-положительный человек точно соблюдает все предписания врача: 1. проходить систематически медицинское обследование с учетом графика, установленного врачом; 2. принимать лекарственные препараты своевременно и строго в предписанной врачом дозе; 3. ставить в известность врача обо всех нарушениях, которые могли иметь место в приеме АРВТ; 4. сообщать лечащему доктору обо всех изменениях в состоянии здоровья, которые могут быть связаны с действием препаратов АРВТ; 5. соблюдать все рекомендации врача относительно питания, диеты и образа жизни; 6. не принимать любые другие медицинские препараты без консультации лечащего врача.

Таким образом, в настоящее время процесс лечения, обуславливающий качество жизни больных ВИЧ-инфекцией, напрямую зависит от сочетания обоих факторов: эффективности подобранной схемы лечения и приверженности терапии. Так, при низкой приверженности любое лечение неэффективно, как и неэффективна высокая приверженность терапии без самих препаратов и правильно выбранной врачом схемы их применения [1]. По данным за 2015 год, в России антиретровирусную терапию получали 230 022 человека. В то же время, охват лечением антиретровирусными препаратами составил всего лишь 28 % от числа зарегистрированных лиц, живущих с диагнозом ВИЧ-инфекция на территории Российской Федерации, среди состоявших на диспансерном наблюдении 37% ВИЧ-положительных были привержены АРВТ. Поскольку охват антиретровирусной терапией в России остается низким, то в последние годы отмечается тенденция к росту смертности среди инфицированных ВИЧ: с 15,7 в 2013 году до 18,8 в 2015 году на 100 000 населения. На 6-10% в год растет и количество женщин с вновь выявленной ВИЧ-инфекцией. Поэтому особое внимание необходимо уделять приему антиретровирусных препаратов в период беременности и усиленной профилактике у детей из групп повышенного риска. Так, более чем у 75% женщин, принимавших химиопрепараты во время беременности, уже к 36 неделе вирусная нагрузка снижалась почти до неопределяемого уровня (менее 50 копий/мкл.), что, безусловно, относится к благоприятному прогностическому признаку уменьшения риска передачи ВИЧ от матери ребенку. Тем не менее, в 2015 году 0,9% всех случаев ВИЧ-инфекции приходилось на детей, инфицированных матерями во время беременности, родов и при грудном вскармливании [3].

Одним из показателей эффективности проводимой антиретровирусной терапии может служить отсутствие вторичных инфекционных осложнений, в том числе активных форм оппортунистических инфекций (ОИ).

Цель исследования — изучить зависимость выявления маркеров ОИ от приверженности АРВТ у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, на примере герпесвирусных инфекций (ГВИ) и пневмоцистоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На маркеры ГВИ и пневмоцистоза были исследованы образцы сывороток и клеток крови, полученные от детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями. Методом ИФА определяли IgM и IgG к вирусу простого герпеса (ВПГ), вирусу Эпштейна-Барр (ВЭБ), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу герпеса человека шестого типа и к пневмоцисте. Методом непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ) исследовали клетки крови на наличие указанных возбудителей и их антигенов. Для выявления ранних антигенов ЦМВ, ВГЧ-6 и репродукции вирусов ВПГ и ВЭБ применяли быстрый культуральный метод (БКМ).

Всего были исследованы образцы биологических материалов 66 детей с ВИЧ-инфекцией в возрасте от 1 месяца до 15 лет. Все дети находились на лечении в Детском боксированном отделении ИКБ №2 Москвы и были разделены на 2 группы. В первую вошли груднички от месяца до полутора лет с диагнозом «неокончательный тест на ВИЧ». Это — младенцы с положительным результатом исследования на антитела в ИФА—иммуноблот и с отрицательным результатом на ДНК ВИЧ в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Следует отметить, что матери этих детей в полном объеме получили АРВТ во время беременности. Вторую группу составили дети, у которых диагноз «ВИЧ-инфекция» подтвержден обнаружением IgG в ИФА — иммуноблот и ДНК ВИЧ в ПЦР. Последняя группа была подразделена на две подгруппы: дети из закрытых организованных коллективов (дом ребенка, детский дом, интернат) и дети, проживающие в семье.

В зависимости от приверженности АРВТ все ВИЧ-позитивные дети как организованные, так и домашние, в свою очередь, также были подразделены на три подгруппы: дети, получающие АРВТ в полном объеме, не в полном объеме и не получающие АРВТ.

АРВТ детям назначается по клиническим, иммунологическим и вирусологическим показаниям [Idele P. et al., 2014]. При снижении показателей иммунного статуса, тромбоцитопении, при клинических проявлениях инфекционных заболеваний, а также для профилактики развития инфекций помимо АРВТ назначают иммунозаместительную терапию, которую проводят такими препаратами как Октагам, Пентаглобин, ИГ-Вена. Для неспецифической медикаментозной профилактики пневмоцистоза используют бисептол (ко-тримоксазол+триметоприм) [Ермак Т.Н. и др., 2011].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы, рассчитывающей достоверность различия долей признака в двух группах по критерию Стьюдента (t) [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, в полном объеме АРВТ получили 56,0% обследуемых детей, в неполном — 16,7%, у 27,3% детей приверженность АРВТ отсутствовала полностью.

Дети с неокончательным диагнозом ВИЧ-инфекции в 100% случаев были охвачены АРВТ, так как их матери получали химиопрепараты на всех сроках беременности, тогда как только половина ВИЧ-позитивных детей, проживающих в детских социальных учреждениях (44,4%) и семьях (50,0%), имели приверженность АРВТ в полном объеме. АРВТ не в полном объеме получили 27,8% домашних детей. Более половины организованных детей (55,6%) АРВТ не получали совсем, число таких детей в семьях было в два раза меньше и составило 22,2%. Среди ВИЧ-позитивных, проживающих в детских учреждениях, случаев применения АРВТ не в полном объеме зафиксировано не было.

С целью изучения влияния АРВТ на распространение и активацию ОИ среди детей, рожденных ВИЧ-позитивными матерями, были исследованы образцы сывороток и клеток крови на различные маркеры ВПГИ, ВЭБИ, ЦМВИ, ВГЧ-6 и пневмоцисто́за.

Анализ результатов показал, что в среднем больше, чем у половины младенцев с неокончательным тестом на ВИЧ (58,3%), какие либо маркеры диагностируемых ОИ отсутствовали. У 25% из них на основании выявления только IgG в титрах, не превышающих диагностическую сероконверсию (четырёхкратное нарастание диагностического титра), была установлена латентная инфекция. У 16,7% детей этой группы были определены маркеры активных ОИ, т.е. обнаружены изолированные IgM, IgM сочетанные с IgG, а также сочетание антител одного или обоих классов с детекцией возбудителя и его антигенов методами НРИФ и БКМ. Следует отметить, что половина младенцев (50,0%) имели только IgG к ВПГ, указывающие на латентное течение этой инфекции. Реже всего диагностировали латентный пневмоцистоз (8,3%) и ВГЧ-6 инфекцию (16,7%); по 25% приходится на латентные ВЭБИ и ЦМВИ. В то же время, наиболее часто определяли маркеры активной ВЭБ-инфекции — у 41,7% обследованных этой группы. Активную пневмоцистную инфекцию диагностировали значительно реже — у 16,7% детей, а активные ВПГИ, ЦМВИ, ВГЧ-6 выявили у одинакового числа детей — у 8,3%.

Обследование детей с ВИЧ подтвержденной инфекцией, проживающих как в социальных учреждениях, так и в семьях показало, что маркеры ОИ чаще выявляли у детей, получавших АРВТ в полном, а также и не в полном объеме, чем у детей, которым она не проводилась. У всех детей этих подгрупп помимо активных и латентных инфекций определяли стадию реконвалесценции, IgG в высоких титрах (превышающих диагностическую сероконверсию, при отсутствии других маркеров инфекции) и свидетельствующих о уже перенесенном остром заболевании. Среди детей, получивших АРВТ в полном объеме, диагностировали активные ОИ: ВПГИ — у 16,7% домашних и 22,2% организованных детей, ВЭБИ — у 19,4% и 5,5% соответственно. Острая пневмоцистная инфекция была выявлена у 11,1% больных из детских учреждений и у 8,3% детей, проживающих в семьях. Маркеры активных ЦМВ и ВГЧ-6 инфекций не были выявлены ни у одного организованного ребенка, тогда как у домашних детей в 5,6% случаев была установлена активная ЦМВИ, а в 11,1% случаев — активная ВГЧ-6. Латентные инфекции были обнаружены как у организованных, так и у домашних ВИЧ-позитивных детей, получивших АРВТ в полном объеме. По 33,3% случаев латентной инфекции в обеих подгруппах приходится на ЦМВИ, 27,8% организованных детей и 19,4% домашних имели IgG к ВЭБ, 16,7% и 13,9% — к ВПГ, 16,7% и 2,8% — к ВГЧ-6, 5,5% и 19,4% — к пневмоцисте соответственно.

Следует обратить внимание на то, что у ВИЧ-инфицированных детей, не получавших АРВТ, как домашних, так и организованных значительно реже выявляли маркеры активных и латентных ОИ, чем у детей, получивших ее в полном и не полном объеме. Случаи реконвалесценции ОИ приблизительно с одинаковой частотой встречали во всех подгруппах вне зависимости от приверженности АРВТ. Необходимо отметить, что среди детей, не получавших АРВТ совсем, маркеры как активных, так и латентных инфекций значительно чаще выявляли у организованных, чем домашних детей.

Обследование детей с неокончательным тестом на ВИЧ, несмотря на проведенную в полном объеме химиотерапию матерям, показало, что 25,0% детей имели латентные и 16,7% активные ОИ. Учитывая возраст детей, от месяца до полутора лет, выявленные IgG в титрах, не превышающих диагностическую сероконверсию, могут быть связаны не с латентно протекающими инфекциями, а обусловлены сохранением у них материнских антител. В то же время, обнаружение активных форм ГВИ и пневмоцистоза, являющихся СПИД-маркерными инфекциями, свидетельствующими об иммунодефицитном состоянии, позволило детям из этой группы (R-75 — неокончательный тест на ВИЧ) перевести в группу ВИЧ-позитивных (B-23) и незамедлительно назначить им АРВТ.

В соответствии с российскими рекомендациями антиретровирусная терапия проводится всем больным ВИЧ-инфекцией стадий 4 (4А, 4Б и 4В) и 5. Показанием к назначению АРВТ является иммуносупрессия (количество CD4-лимфоцитов менее 350/мкл), гематологические нарушения (анемия, тромбоцитопения), а также тяжелые и рецидивирующие вторичные инфекции. Лечение больных в остром периоде ВИЧ-инфекции показано, если у пациента обнаружено снижение числа CD4-лимфоцитов менее 1200/мл (стадии 2А и 2Б) или установлена стадия ВИЧ-инфекции 2В (острая ВИЧ-инфекция с вторичными заболеваниями). Терапия проводится комбинированно, то есть 3 препаратами одновременно, она направлена на блокаду репликации РНК вируса, что приводит к снижению вирусной нагрузки в крови больных и, как следствие, сохранению иммунных функций организма. Однако в связи с различными факторами (социальными, личной убежденностью больных), не все пациенты получают АРВТ в полном объеме, чаще — не в установленное время или пропускают приемы лекарств. Это ведет к активной репродукции вируса, прогрессированию вторичной иммуносупрессии и вторичным инфекционным осложнениям. Именно поэтому у домашних детей, получавших АРВТ в полном и неполном объеме, а также у организованных детей, получавших АРВТ только в полном объеме, маркеры активных ГВИ и пневмоцистоза выявляли значительно чаще, чем у детей, не получавших лечение из-за отсутствия медицинских показаний к нему (более сохранная иммунная система). У детей, получающих терапию антиретровирусными препаратами в полном объеме при соблюдении приверженности лечению и коррекции иммунитета все активные формы ОИ перейдут в латентные формы. Среди детей, не получавших АРВТ, маркеры оппортунистических инфекций встречались несколько чаще в организованных коллективах, что обусловлено более тесным контактом детей внутри коллектива и, как следствие, более интенсивной реализацией путей и механизмов передачи возбудителей ОИ. Результаты проведенного исследования выявили среди ВИЧ-позитивных детей, не получавших АРВТ по медицинским показаниям, случаи активных ГВИ и пневмоцистоза, что явилось показанием к ее незамедлительному назначению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кибец Е.В., Коваленко Т.А., Евдокимова И.А. Приверженность к АРВ-терапии у ВИЧ-положительных детей на разных возрастных этапах. М., Спецкнига, 2014.
2. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. Проверка гипотез о равенстве долей признака в двух и более совокупностях. 2004.
3. Латышева И.Б., Воронин Е.Е. ВИЧ-инфекция у женщин в РФ. Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. СПб, Человек и его здоровье, 2016.

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИРОДНЫХ СИМБИОЗОВ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Н.В.Немцева, О.А.Гоголева, М.Е.Игнатенко

БИОМЕДИЦИНСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АЛЬГО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИМБИОЗОВ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Представлен анализ последних опубликованных работ по взаимодействию между микроводорослями и бактериями. Микроводоросли, являясь результатом многомиллионной эволюции, способны к взаимодействию друг с другом, а также и с другими организмами. Взаимодействия между водорослями и бактериями демонстрируют разнообразие способов коммуникации от мутуализма до паразитизма. Они могут существенным образом влиять на поддержание жизнедеятельности, определяя вектор направленности связей, и в итоге, обеспечивая целостность экосистем. У исследователей возрастает внимание к альго-бактериальным симбиозам как продуцентам биомассы, а также биологически активных соединений. Направленное развитие зеленых биотехнологий нацеливает на создание новых направлений использования альго-бактериальных взаимодействий. Проанализированные материалы свидетельствуют о высоком фундаментальном и прикладном потенциале симбиозов микроводорослей с бактериями для биологии и медицины.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 82—87

Ключевые слова: микроводоросли, бактерии, симбиоз, альгобактериальные взаимодействия, биотехнология

N.V.Nemtseva, O.A.Gogoleva, M.E.Ignatenko

BIOMEDICAL POTENTIAL OF ALGO-BACTERIAL SYMBIOSES

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

The analysis of the latest published works on the interactions between microalgae and bacteria is presented. Microalgae as a result of multimillion evolution can interact with each other and with another microorganisms. Interactions between algae and bacteria demonstrate a variety of communication from mutualism to parasitism. They can significantly affect the maintenance of vital activity, determines the direction vector, ensure the integrity of ecosystems. In modern society the attention of researches to algae-bacterial symbiosis increases as a biomass producer and as biologically active compounds. The development of green biotechnology is aimed at creating new directions for the use of algae-bacterial interactions. The analyzes materials testify to the high fundamental and applied potential of symbiosis microalgae with bacteria for biology and medicine.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 82—87

Key words: microalgae, bacteria, symbiosis, algobacterial interactions, biotechnology

Микроводоросли, являясь результатом многомиллионной эволюции, способны к взаимодействию друг с другом, а также и с другими организмами [3, 10]. Теперь уже невозможно составить полное представление о биологии и экологии этих древнейших фотосинтезирующих организмов, изучая их в

отрыве от бактериальных симбионтов. Разнообразие способов взаимодействия от мутуализма до паразитизма может существенным образом влиять на поддержание их жизнедеятельности, определяя вектор направленности связей, а также обеспечивая целостность экосистем [23, 27]. Имеется множество свидетельств партнерских взаимоотношений бактерий и водорослей в природной среде. Между водорослями и бактериями-симбионтами осуществляется обмен нутриентами [23]. Установлено наличие сигнальной трансдукции, а также переноса генов [20, 22, 28, 34].

В процессе фотосинтеза водоросли выделяют органические вещества, которые являются источником растворенного углерода для гетеротрофных бактерий, обитающих на поверхности водорослевых клеток, в их фикосфере. Существует мнение, что фикосфера, характеризующаяся повышенным содержанием фиксированного органического углерода, для гетеротрофных бактерий эквивалентна оазису [27, 31]. Кроме обмена углерода, описаны также азотно-опосредованные отношения, складывающиеся между микроводорослями и гетеротрофными бактериями [23].

В симбиотических системах водорослями продуцируются полиненасыщенные жирные кислоты, полисахариды, пигменты, биоактивные пептиды, минералы и ферменты [13]. В свою очередь, бактериальные симбионты способны обеспечивать водорослевого хозяина витаминами, гетероауксинами и другими биологически активными соединениями. Имеются сведения, что продуцируемый бактериями витамин В12, а также бактериальные сидерофоры участвуют в стимуляции быстрого роста водорослей в альго-бактериальных сообществах [12, 16]. При этом оба партнера, как водоросли, так и бактерии, способны изменять свой метаболизм для удовлетворения потребностей друг друга. Подобный феномен продемонстрирован на примере альго-бактериальных ассоциаций, в составе которой обнаружены бактерии рода *Roseobacter* [30]. Аналогичные данные получены для других бактерий рода *Rhodococcus*, сопутствующих зеленым водорослям [1].

В современных исследованиях уточняется молекулярная филогения бактериальных симбионтов, коллективную роль которых еще предстоит изучить. Дискутируется вопрос об имеющем место специфическом взаимодействии между водорослевым хозяином и его бактериальными симбионтами [18, 22]. В наших исследованиях обоснован симбиотический подход к оценке структурной организации природного и экспериментального фитопланктонного сообщества, в котором выявлена многокомпонентность и сложная интеграция по типу ассоциативного симбиоза. Показано, что ассоциативные связи определяются наличием основного партнера или хозяина (*Chlorophyta*), стабильных доминантных микропартнеров (*Euglenophyta*, *Dinophyta*, *Bacillariophyta*, *Chrysophyta*), представленных группой взаимозаменяемых симбионтов, и сопутствующих ассоциативных микросимбионтов (*Cyanophyta*, *Xantophyta*) [6].

Биотехнология микроорганизмов является инновационным сектором в мире. За последние сто лет накоплен значительный опыт в области альгобиотехнологий. Среди массы уже известных науке видов микроводорослей, из огромного числа обитающих на Земле, лишь у малой части (около 40 видов) имеется промышленный потенциал. Их хороший рост и высокая урожайность являются предпосылкой их коммерческого применения. По результатам оценки основных тенденций в области патентования ком-

мерческое значение имеют зеленые водоросли (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Tetraselmis*), диатомовые водоросли (*Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Chaetoceros*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*) и некоторые другие, представляющие интерес для производства биопродуктов, биотоплива, фармацевтических препаратов и т.п. [32]. Более глубокое понимание контроля взаимодействия между микроводорослями и бактериями должно быть полезно для повышения эффективности производства биомассы этих микроорганизмов и связанных с ними ценных соединений. Однако активное культивирование микроводорослей началось всего несколько десятилетий назад. Помимо естественно произведенных соединений микроводоросли могут стать альтернативой для производства фармацевтических препаратов для экспрессии рекомбинантных белков и других ценных продуктов [33].

Существующие тесные альго-бактериальные связи, с одной стороны, еще изучены недостаточно из-за обременительной задачи разделения партнеров, состоящих друг с другом в сильной естественной связи [27]. С другой стороны, по этой же причине современными биотехнологами ведется поиск подходов эффективного использования альго-бактериальных взаимодействий [29].

При искусственном моделировании альго-бактериального симбиоза наметились две стратегии укрепления связей между микроводорослями и бактериями. Первая стратегия опирается на поиск средств, обеспечивающих искусственное наращивание объема фикосферы. Вторая стратегия обеспечивается введением бактериальных симбионтов, обладающих определенными свойствами. В свете этого на модели *Chlorella sorokiniana* предложена методика построения искусственных альго-бактериальных сообществ, пригодных для производства ферментированных продуктов питания, а также для промышленной очистки сточных вод [19].

Изучение механизмов, лежащих в основе взаимодействия водорослей и бактерий, может способствовать разработке эффективных пока еще неиспользованных биотехнологических процессов. Взаимодействия хозяина со своей микробиотой широко изучаются у человека [24]. Показано, что в микробиоценозе — открытой саморегулирующейся системе, представленной совокупностью популяций автохтонных и аллохтонных видов, осуществляются сложные биокоммуникативные взаимоотношения, исходом которых определяется гомеостаз человека. Методологическим ключом к пониманию межмикробных взаимодействий может явиться система распознавания «свой-чужой» [3]. Предложенный данными исследователями метод межмикробного распознавания «свой-чужой» в паре «доминант-ассоциант» базируется на определении биологических параметров: ростовых свойств, биоуплотнения и антилизотимной активности, что предлагается для практической реализации в качестве базового метода при отборе пробиотических штаммов и культур микроорганизмов при создании новых симбиотических композиций. В наших исследованиях выявлено, что альго-бактериальные взаимоотношения могут быть построены на основе функциональных связей «лизотим-антилизотим», а также «каталаза-перекись водорода». Реакция каталазы бактериальных симбионтов на взаимодействия с водорослевым хозяином может быть пригодна для распознавания «свой-чужой» при создании искусственных композиций [2]. В итоге использование микробных симбионтов для стимуляции роста культуры микроводорослей позволяет наращивать производство биомассы водорослей как ценного пищевого продукта.

В смешанном сообществе в результате межмикробных взаимодействий достигается эффект усиления общего выхода продукта, что представляет особую значимость для масштабного производства биоэнергии [29]. Производительность липидов в смешанных культурах может достигаться применением разных подходов: варьированием объемов инокулятов, а также регуляцией удельной скорости роста автотрофного и гетеротрофного компонентов [26].

Участие в quorum сигнализации — еще одна форма альго-бактериальных взаимодействий. Показано, что водоросли способны выделять алкилоксибензолы, ацил-гомосерин лактоны, регулируя образование зрелой биопленки [21]. Процесс биопленкообразования — обычное явление, происходящее как в естественных, так и в искусственных системах. Данный процесс обеспечивается за счет продукции бактериями полимерного биоматрикса, биологическое значение которого рассмотрено [14]. Для инициации этого процесса помимо твердой поверхности микроорганизмы нуждаются в воде [11]. Значение мультивидовых биопленок в экологии, медицине и биотехнологии подробно рассмотрено в [8]. Отмечено, что формирование биопленок обеспечивает защиту сообщества от неблагоприятных условий внешней среды. Исследования показывают, что защитный эффект для микроорганизмов, входящих в состав мультивидовых биопленок, резко возрастает. Одним из примеров подобных образований являются микробные маты, в которых одним из основных структурирующих организмов являются цианобактерии. Наиболее часто мультивидовые биопленки используются в биологической очистке сточных вод. Предложены детально разработанные различные технологические схемы, используемые в крупномасштабных сооружениях по очистке сточных вод различного генеза и состава [8]. Продемонстрирован новый подход очистки сточных вод, содержащих углеводороды. При использовании мультивидовых биопленок, содержащих кроме нефтеокисляющих бактерий еще и кислородные фототрофные микроорганизмы, обеспечивающие кислородом монооксигеназы нефтеокислителей, удалось повысить эффективность биодеструкции [9].

В последнее время в научной литературе обсуждается вопрос позитивного значения биопленок в системах водоочистки и подачи воды. Предполагается, что автохтонная микрофлора, поглощая питательные вещества из воды, выполняет свою естественную функцию самоочищения [15]. Напротив, негативным проявлением биопленкообразования является то, что биопленки способны подвергаться инфицированию условно патогенными микроорганизмами. Это создает проблему для здоровья потребителей питьевой воды. В наших исследованиях выявлено присутствие в артезианской воде автохтонной микрофлоры, способной к биопленкообразованию на всех технологических этапах водоподготовки. Кроме бактерий в организации биопленок участвовали микроводоросли и протисты. Отмечена возможность сохранения микрофлоры с высоким персистентным потенциалом [7]. Эволюционно сложившийся механизм существования микроорганизмов в биопленках, обеспечивающий устойчивость к дезинфекции и промывке систем, нацеливает на поиск новых подходов борьбы с этим явлением. В данном аспекте интерес представляют находки микроорганизмов, продуцирующих метаболиты, вносящие помехи в систему кворумного зондирования (QS). Это явление получило название quorum quenching (QQ) [17]. Поиск подобных метаболитов перспективен для развития новых биологических подходов в борьбе с биообрастанием.

Таким образом, внимание исследователей к альго-бактериальным симбиозам как продуцентам биомассы, а также биологически активных веществ в современном обществе возрастает. Направленное развитие зеленых технологий нацеливает на создание новых технологий на основе альго-бактериальных симбиозов. Практическое применение некоторых симбиотических культур уже достигло уровня коммерциализации, например, для производства биомассы, а также для биоремедиации объектов окружающей среды. Ряд других альго-бактериальных ассоциаций еще только рассматривается в качестве объекта потенциального применения в медицине, фармацевтической промышленности и др. Все вышеизложенное свидетельствует о высоком фундаментальном и прикладном потенциале альго-бактериальных симбиозов для биологии и медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова Е.В., Ногина Т.М. Бактерии рода *Rhodococcus*, сопутствующие зеленым водорослям в природе и при лабораторном культивировании. Гидробиол. журнал. 1997, 3: 44-50.
2. Бухарин О.В., Немцева Н.В. Микробиология биоценозов природных водоемов. Екатеринбург, УрО РАН, 2008.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиозы. Екатеринбург, УрО РАН, 2014.
4. Плаголева О.А., Зенова Г.Ш., Добровольская Т.Г. Взаимодействие водорослей и бактерий-спутников в ассоциативных культурах. Альгология. 1992, 2(2): 57-63.
5. Горобец О.Б., Блинкова Л.П., Батура А.П. Влияние микроводорослей на жизнеспособность микроорганизмов в естественной и искусственной среде обитания. Журн. микробиол. 2001, (1): 104-108.
6. Немцева Н.В. Гидробиоценозы — модельная система ассоциативного симбиоза. Журн. микробиол. 2015, (4): 49-54.
7. Немцева Н.В. Изучение образования биопленок в питьевой воде в процессе водоподготовки. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). 2017, 2: 1-10.
8. Ножевникова А. Н., Бочкова Е. А., Плакунов В. К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. Микробиология. 2015, 84(6): 623-644.
9. Al-Maillem D.M., Kansour M.K., Radwan S.S. Hydrocarbonoclastic biofilms based on sewage microorganisms and their application in hydrocarbon removal in liquid wastes. Can. J. Microbiol. 2014, 60(7): 477-486.
10. Cooper M.B., Smith A.G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. Curr. Opin. Plant. Biol. 2015, 26: 147-153
11. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell E. et al. Microbial Biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 1995, 49: 711-745.
12. Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E. et al. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. Nature. 2005, 438 (7064): 90-93.
13. Cuellar-Bermudez S.P., Aguilar-Hernandez I., Cardenas-Chavez D.L. et al. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Microb. Biotechnol. 2015, 8 (2): 190-209.
14. Decho A. W. The EPS Matrix as an Adaptive Bastion for Biofilms: Introduction to Special Issue. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14 (12): 23297-23300.
15. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 2010, 8(9): 623-633.
16. Fuentes J. L., Garbayo I., Cuaresma M. et al. Impact of Microalgae-Bacteria Interactions on the Production of Algal Biomass and Associated Compounds. Mar. Drugs. 2016, 14(100): 1-16
17. Grandclément C., Tannières M., Moréra S. et al. Quorum quenching: role in nature and applied developments. FEMS Microbiol. Rev. 2016, 40(1): 86-116.
18. Hester E. R., Barott K. L., Nulton J. et al. Stable and sporadic symbiotic communities of coral and algal holobionts. The ISME Journal. 2016, 10: 1157-1169.
19. Imase M., Watanabe K., Aoyagi H. et al. Construction of an artificial symbiotic community using a *Chlorella*-symbiont association as a model. FEMS Microbiol. Ecol. 2008, 63(3): 273-282.

20. Karuppiyah V., Alagappan K., Li Zh. Coral Holobiont Omics: Microbes and Dinoflagellates. *In: Marine OMICS: Principles and Applications* (Ed. Se-Kwon Kim). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. 2016, 8:133-163.
21. Kouzuma A., Watanabe K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015, 33: 125-129.
22. Krohn-Molt I., Wemheuer B., Alawi M. et al. Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial—algal interactions in photobioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013, 79(20): 6196-6206.
23. Lakaniemia A.-M., Hulatt C. J., Wakeman K. D. et al. Eukaryotic and prokaryotic microbial communities during microalgal biomass production. *Bioresource Technology*. 2012, 124: 387-393.
24. *Microbiota of the Human Body, Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Ed. A. Schwiertz). Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
25. Natrah F.M., Bossier P., Sorgeloos P. et al. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Rev. Aquaculture*. 2013, 6: 48-61.
26. Papone T., Kookkhunthod S., Leasing R. Microbial oil production by monoculture and mixed cultures of microalgae and oleaginous yeasts using sugarcane juice as substrate. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2012, 64: 1127-1131.
27. Ramanan R., Kim B.H., Cho D.H. et al. Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnol. Adv.* 2016. 34 (1): 14-29.
28. Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I. Symbiosis and Development: The Hologenome Concept. *Birth Defects Research (Part C)*. 2011, 93: 56-66.
29. Santos C. A., Reis A. Microalgal symbiosis in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, 98 (13): 5839-5846.
30. Sule P., Belas R.A. Novel Inducer of *Roseobacter* Motility Is Also a Disruptor of Algal Symbiosis. *J. Bacteriol.* 2013, 195 (4): 637-646.
31. Takemura A.F., Chien D.M., Polz M.F. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Front Microbiol.* 2014, 5 (38): 1-26.
32. Tate J. J., Gutierrez-Wing M. T., Rusch K. A. et al. The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp. *J. Plant Growth Regulation*. 2013, 32 (2): 417-428.
33. Yan N., Fan C., Chen Y. et al. The Potential for Microalgae as Bioreactors to Produce Pharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17 (6): 962-986.
34. Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32 (5): 723-735.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.А.Селиванова¹, Ю.А.Хлопко¹, Н.Е.Гоголева^{2,3}, А.О.Плотников¹

ДЕТЕКЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ В СОЛОНОВАТЫХ РЕКАХ ПРИЭЛЬТОНЬЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Казанский институт биохимии и биофизики; ³ Казанский (Приволжский) федеральный университет

Цель. Выявить потенциально патогенных бактерий в планктоне солоноватых рек Приэльтонья методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК. *Материалы и методы.* Образцы воды из солоноватых рек Ланцуг и Чернавка, впадающих в озеро Эльтон, отбирали в объеме 50 мл, фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Тотальную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной гомогенизацией и ферментативным лизисом. ДНК-библиотеки для секвенирования создавали по протоколу Illumina с праймерами к варибельному участку V3—V4 гена 16S рРНК. Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina», США). *Результаты.* В планктонных образцах солоноватых рек Приэльтонья были обнаружены филоциты потенциально патогенных бактерий филума Proteobacteria из семейств Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Campylobacteraceae,

Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Legionellaceae, Alcaligenaceae, Campylobacteraceae, а также филумов Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria. Вероятным источником бактериального загрязнения является крупный и мелкий рогатый скот. *Заключение.* Полученные данные демонстрируют, что солоноватые континентальные водоемы наряду с пресными и морскими выполняют резервуарную функцию для потенциально патогенных микроорганизмов. Высокопроизводительное секвенирование может быть использовано для скрининговой оценки присутствия патогенов в воде.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 87—95

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, солоноватые водоемы, потенциально патогенные микроорганизмы, антропогенная нагрузка, бактериопланктон, санитарное состояние

*E.A.Selivanova*¹, *Yu.A.Khlopko*¹, *N.E.Gogoleva*^{2,3}, *A.O.Plotnikov*¹

DETECTION OF POTENTIALLY PATHOGENIC BACTERIA IN THE BRACKISH RIVERS FLOWING INTO THE ELTON LAKE BY HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics; ³Kazan Federal University, Russia

Aim. To indicate potentially pathogenic bacteria in plankton of the brackish rivers flowing into the Elton Lake by high-throughput sequencing of 16S ssuRNA gene. *Materials and methods.* The water samples from brackish rivers Lantsug and Chernavka, flowing into the Elton Lake, were taken up in a volume of 50 ml, filtered through membrane filters (pore diameter — 0.22 µm). Total DNA was obtained by phenol-chloroform extraction with preliminary homogenization and enzymatic lysis. DNA libraries for sequencing were created by protocol Illumina with primers to a variable V3—V4 region of 16S ssuRNA gene. Sequencing was performed on a platform MiSeq («Illumina», США). *Results.* There were found the phylotypes of potentially pathogenic bacteria of *Proteobacteria* phylum from the families *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Campylobacteraceae*, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Legionellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Campylobacteraceae*, and also of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* phyla in the plankton samples of the brackish rivers. Probable source of bacterial contamination is large and small cattle. *Conclusion.* These data demonstrate that the continental brackish waters, along with freshwater and marine habitats perform a reservoir function to potentially pathogenic microorganisms. High-throughput sequencing can be used to screen the presence of pathogens in water.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 87—95

Key words: high-throughput sequencing, brackish water bodies, potentially pathogenic bacteria, anthropogenic load, bacterioplankton, sanitary condition

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенные и условно патогенные бактерии могут длительно персистировать в водных экосистемах, используя стратегии выживания, в основе которых лежит индивидуальный ответ бактериальных клеток на стресс или популяционная перестройка (адсорбция к частицам осадка, формирование биопленок или персистенция в организме гидробионтов). Многие виды бактерий способны длительно сохраняться в ассоциациях с простейшими [4]. Способствует сохранению патогенных микроорганизмов и их переходу из покоящегося в вирулентное состояние цветение микроводорослей в водоеме [15].

Существует более 100 признанных видов патогенных микроорганизмов, которые можно обнаружить в загрязненной воде рекреационного и питьевого назначения [15]. Несмотря на постоянные усилия по обеспечению безопасности воды, вспышки инфекций, связанных с передачей через воду, по-прежнему регистрируются по всему миру. Известна возможность передачи водным путем бактерий *Salmonella* и *Campylobacter* — частых возбудителей гастроэнтеритов, а также *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Yersinia*. Подробно изучена роль водной среды в передаче и распространении *Legionella pneumophila*, способной персистировать внутри клеток простейших. Список патогенных и условно патогенных микроорганизмов, для которых вода является вероятным фактором передачи, продолжает расширяться.

Морские водоемы, имеющие рекреационное значение, наряду с питьевыми источниками и морепродуктами являются важным фактором передачи инфекций водным путем. Примером могут быть случаи цистита, вызванного *Vibrio cholerae* не O1, у купающихся, тяжелой раневой инфекции, осложнившейся остеомиелитом, септициемией, поражением центральной нервной системы и эндометрита, возбудителем которых явился *Vibrio alginolyticus* из морской воды, а также гангрена и сепсис, вызванные *Vibrio parahaemolyticus* [13]. Значение континентальных соленых и солоноватых водоемов как резервуара для потенциально патогенных микроорганизмов изучено в меньшей степени, хотя многие из подобных водоемов активно используются в качестве курортной базы.

Последние публикации свидетельствуют о необходимости усиления мониторинга микробных агентов в водоемах для повышения возможностей раннего предупреждения и профилактики вспышек инфекционных заболеваний с водным путем передачи, особенно в условиях глобальных изменений климата [14].

Культуральные методы могут существенно недооценить присутствие патогенных бактерий в воде вследствие перехода жизнеспособных бактерий в некультивируемое состояние. Поэтому разрабатываются методы прямой детекции патогенов в образцах с использованием молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР, мультиплекс-ПЦР, ПЦР в режиме реального времени, FISH-гибридизация, пиросеквенирование, технологии на основе микрочипов, которые позволяют осуществлять прямую детекцию определенных патогенов, идентифицировать, генотипировать, определять численность и жизнеспособность патогенных бактерий, вирусов и простейших, отслеживать источники загрязнения [5]. Использование современных молекулярно-генетических технологий важно для выявления источников загрязнений, устранения путей передачи инфекций и более реалистичной оценки уровня риска для здоровья населения. Среди таких методов одним из наиболее точных и перспективных является метагеномный анализ микробных популяций, который позволяет провести тотальную оценку состава микробного сообщества, выявив потенциально патогенные виды, включая некультивируемые формы.

Целью данной работы является детекция потенциально патогенных бактерий в планктоне солоноватых рек Приэльтона методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробы воды из рек Чернавка и Ланцуг, впадающих в озеро Эльтон (Волгоградская область), были отобраны в августе 2015 г. Минерализация воды в среднем течении рек Ланцуг и Чернавка составляла 21 и 24 ‰ соответственно. Образцы объемом 50 мл фильтровали через мембранные фильтры с

диаметром пор 0,22 мкм. Тотальную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с предварительной гомогенизацией и ферментативным лизисом. Для исключения возможной контаминации на этапе пробоподготовки использовали отрицательный контроль. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле и фотометрии на приборе NanoDrop 8000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). ДНК-библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina с праймерами к варибельному участку V3-V4 гена 16S рРНК S-D-Bact-0341-b-S-17 и S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013). Секвенирование проводили на платформе MiSeq («Illumina», США) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

Данные секвенирования обрабатывали комплексом биоинформационных программ USEARCH v8.0.1623_win32 [2], включая слияние парных ридов, фильтрацию ридов по качеству и длине (минимальный размер — 300 bp), удаление химер, даблтонов и синглтонов, кластеризацию ридов в ОТЕ на уровне сходства 97%. Таксономическую классификацию ОТЕ проводили с использованием интерактивного инструмента VAMPS с использованием базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Некоторые ОТЕ выравнивали с использованием алгоритма BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на базу данных нуклеотидных последовательностей nr/nt (NCBI).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК изучен таксономический состав прокариот и проанализировано присутствие потенциально патогенных микроорганизмов (табл.) в планктоне двух солоноватых рек Ланцуг и Чернавка, впадающих в озеро Эльгон (Волгоградская область). Эти реки находятся на территории природного парка Эльгонский, что обуславливает минимальную антропогенную нагрузку. Однако в среднем течении р. Ланцуг проводится выпас крупного и мелкого рогатого скота.

В библиотеках исследованных образцов большинство флотипов потенциально патогенных бактерий относилось к филуму Proteobacteria. В образце из реки Ланцуг среди ОТЕ, относящихся к семейству Enterobacteriaceae, присутствовали *Pantoea vagans*, *Serratia* spp., *Rahnella aquatilis*, а в образце из реки Чернавка — *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Morganella morganii* и неидентифицированные представители семейства Enterobacteriaceae. Широко было представлено семейство Vibrionaceae, к которому относился 31 флотип из библиотеки образца р. Чернавки и 13 флотипов из р. Ланцуг, среди них большую часть составлял род *Vibrio* (24 и 10 ОТЕ соответственно), что объяснимо широким распространением галофильных видов вибрионов в природных водоемах. Наряду с видами, характерными для морской воды (*V. kanaloae*), морских беспозвоночных (*V. tritoni*) и рыб (*V. anguillarum*), были выявлены флотипы, близкие к патогенным для человека *V. cholerae* O1 biovar El Tor и *V. alginolyticus* (возбудители гастроэнтеритов и раневой инфекции). Семейство Pseudomonadaceae было представлено 2 ОТЕ в образце р. Чернавка и 15 в образце р. Ланцуг, из которых 10 относились к роду *Pseudomonas*. Среди них присутствовали ОТЕ, принадлежащие к условно патогенным видам *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas stutzeri*. Семейство Moraxellaceae было представлено в образце р. Ланцуг 10 ОТЕ, относящимися-

Последовательности фрагментов гена 16S рРНК потенциально патогенных бактерий в планктонных образцах солоноватых рек Ланцуг и Чернавка

Филогенетическое положение	ОТЕ (L-Ланцуг, Ch- Чернавка)	Ближайший культивируемый гомолог в базе данных GenBank (NCBI) (видовое название) (Ac. №)	Сходство с гомологом (%)	Источник выделения	
Proteobacteria	L-359	<i>Pantoea vagans</i> (CP014129.2)	99	рана человека	
Enterobacteriaceae	L-2447	<i>Serratia</i> spp. ATCC 39006 (CP025084.1)	99	солончак, Нью-Джерси, США	
	L-3018	<i>Enterobacter tabaci</i> (MH005094.1)	99	водоем	
		<i>Enterobacter cloacae</i> (CP026975.1)	99	прямая кишка человека	
	L-1692	<i>Rahnella aquatilis</i> (LC191553.1)	99	не указан	
	L-639	<i>Serratia marcescens</i> (CP026702.1)	99	не указан	
	L-4214	<i>Enterobacter</i> spp. (KR189508.1)	98	водоем	
		<i>Klebsiella aerogenes</i> (CP026756.1)	98	не указан	
	Ch-1401	<i>Escherichia coli</i> (LC144553.1)	99	р. Махананда в Индии	
	Ch-1145	<i>Providencia vermicola</i> (KT325058.1)	99	с/х почва	
		<i>Providencia rettgeri</i> ATCC 29944 (FJ971874.1)	99	пациент с оппортунистической инфекцией	
Proteobacteria	Ch-2213	<i>Morganella morganii</i> (KR610526.1)	99	кишечник <i>Drosophila melanogaster</i>	
	L- 77	<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 33868 (CP014053)	99	морская вода	
Vibrionaceae	L- 91	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor (CP026647.1)	99	пациент, больной холерой	
	L- 381	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MG546221.1)	99	не указан	
Pseudomonadaceae		<i>Pseudomonas resinovorans</i> (KT204486.1)	99	загрязненная нефтяными продуктами почва	
	L-301	<i>Pseudomonas</i> sp. (HM038236.1)	99	экскременты носорога	
Proteobacteria	Ch-3149	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (KY643712.1)	99	ризосфера	
		<i>Pseudomonas xanthomarina</i> (KY617784.1)	99	компост из навоза свиней	
	L-187	<i>Acinetobacter</i> spp. (KT372439.1)	99	компост	
	Moraxellaceae		<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 17925 (U10875.1)	98	не указан
		L-3658	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (MF372965.1)	98	вода
	L-1863	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KY616647.1)	97	свежий навоз	
	L-875	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> (KM114925.1)	99	кожа жаб и лягушек	
	Ch -42-166	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (LN774707.1)	99	образец воздуха в туристической пещере	
	Ch -1898	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (KY616668.1)	99	дренажная вода	
	Ch -4345	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (KC305040.1)	93	госпитальный штамм	
L-1321	<i>Alkanindiges hongkongensis</i> (NR_115179.1)	96	пациент с абсцессом околоушной железы		
Proteobacteria	Ch -1880	<i>Aeromonas diversa</i> (KU991519.1)	99	поверхностный водоем	
	L-738	<i>Aeromonas intestinalis</i> (LT630759.1)	99	фекалии человека	
Proteobacteria	L-218	<i>Legionella donaldsonii</i> (KM504126.1)	99	пациент с раком	
	L-1701	<i>Legionella pneumophila</i> (LT906452.1)	96	легкие человека	
	L-3825	<i>Legionella pneumophila</i> OLDA (CP016030.2)	97	пациент, больной легионеллезом	
Proteobacteria	Ch -380	<i>Francisella philomiragia</i> (KU593488.1)	99	пациент	
Francisellaceae	L-646	<i>Alcaligenes</i> sp. (AJ133493.2)	99	пациент с септическим артритом	
	L-2867	<i>Achromobacter pulmonis</i> (KP318449.1)	99	нематоды	
Proteobacteria	L-30	<i>Bordetella</i> spp. (KF851340.1)	98	поверхностные морские воды	
	Ch -90		99		
	L-66	<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (KT225286)	98	содержимое матки коровы	
	Campylobacteraceae	L-486	<i>Arcobacter defluvii</i> (MG195894.1)	99	дренажная вода
L-2265		<i>Arcobacter</i> spp. (LT629995.1)	98	сточные воды	
L-627		<i>Arcobacter skirrowii</i> (MG195899.1)	99	канал, загрязненный городскими сточными водами	
Ch -54		<i>Arcobacter bivalviorum</i> (MF155896.1)	99	моллюски	
Firmicutes	L-157	<i>Staphylococcus equorum</i> (MG937677.1)	99	кожа здоровых лошадей	
	Staphylococcaceae	L-2306	<i>Enterococcus</i> spp. MF134667.1	99	кишечник червя
Firmicutes			<i>Enterococcus gallinarum</i> (CP014067.2)	99	локтевая ямка человека
Enterococcaceae	L-1019	<i>Bacteroides ihuae</i> (NR_147391.1)	98	мокрота человека	
Bacteroidaceae	L-3759	<i>Mycobacterium paraense</i> (KJ949001.1)	98	легкие человека	
Bacteroidetes					
Actinobacteria					
Mycobacteriaceae					

ся к родам *Acinetobacter*, *Alkanindiges*, *Psychrobacter*, в р. Чернавка — 3 ОТЕ рода *Acinetobacter*. Наряду с повсеместной распространенностью этих свободно живущих сапрофитов, среди них выявлены представители, способные вызывать оппортунистические инфекции: *Acinetobacter lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. schindleri*, *A. beijerinckii*, *A. calcoaceticus*, *Alkanindiges hongkongensis*. Внутри семейства *Aeromonadaceae* были обнаружены ОТЕ, близкие к *Aeromonas intestinalis*, выделенному у пациента с гастроэнтеритом [3] и *A. diversa*, выделенному из гнойной раны [9].

В образце из р. Чернавка было обнаружено 12 ОТЕ неидентифицированных представителей семейства *Legionellaceae*, в образце р. Ланцуг — 3 ОТЕ, две из которых были отнесены к хорошо известному патогенному виду рода *Legionella* — *L. pneumophila*, вызывающему тяжелую пневмонию, и один — к *L. donaldsonii*, для которого недавно была описана способность вызывать пневмонию у пациентов с онкологическими заболеваниями [6]. Эта находка интересна, поскольку об обнаружении этих микроорганизмов в морских водоемах имеются лишь единичные данные, и традиционно считается, что легионеллы не способны к выживанию и персистенции в соленых водоемах. Вероятно, сохранению легионелл способствует персистенция внутри клеток галофильных протистов, способствующая увеличению их вирулентности [4].

Семейство *Francisellaceae* было представлено 4 ОТЕ в р. Чернавка, из которых одна была идентифицирована как *Francisella philomiragia* — патогенный для человека вид, и 1 ОТЕ в р. Ланцуг идентифицирована как *F. endociliophora* (симбионт морской инфузории)

Семейство *Alcaligenaceae* было представлено в р. Ланцуг 9 ОТЕ, относительное обилие которых составило 1,16% от общей численности ридов. Среди них были обнаружены флотипы *Alcaligenes* spp., *Achromobacter pulmonis*, которые широко распространены в объектах окружающей среды, но могут вызывать оппортунистические инфекции у людей. В образцах обеих рек также зарегистрировано присутствие неидентифицированных до вида бактерий рода *Bordetella*, лишь отдельные представители которого, например *Bordetella petrii*, обитают во внешней среде.

Семейство *Campylobacteraceae*, самое крупное и наиболее разнообразное среди класса *Epsilonproteobacteria*, составляло значительную долю среди всех ОТЕ образцов. Среди них обнаруживались представители непатогенного рода *Sulfurospirillum* и малоизученного рода *Arcobacter*, среди представителей которого описаны виды, способные вызывать заболевания человека. К роду *Arcobacter* было отнесено 28 ОТЕ из образца р. Чернавка (8,91%), 20 — из образца р. Ланцуг (1,83%). Несмотря на высокие показатели относительного обилия, потенциально патогенных видов в Чернавке выявлено не было, в основном это были азотфиксирующие *A. nitrofigilis* и другие свободноживущие представители морского бактериопланктона. Единственный вид, о патогенности которого нет данных — это выделенный ранее из моллюсков *A. bivalviorum*. Напротив, в реке Ланцуг были выделены ОТЕ, наиболее сходные с *A. cyaerophilus* и *A. skirrowii*, способными вызывать развитие инфекционного процесса у человека и животных (энтерит, бактериемия) и флотип *A. defluvii*, выделявшийся ранее из сточных вод [7].

Среди филума *Firmicutes* также были обнаружены условно патогенные представители. Так, в образце из р. Ланцуг были выявлены флотипы *Enterococcus* spp. и *Staphylococcus equorum*, вида, который является пред-

ставителем нормофлоры и обладает низкой вирулентностью, однако описаны случаи его выделения из клинических образцов как животных, так и человека [11]. Кроме того, среди фирмикут были разнообразно представлены флотипы, относящиеся к семействам *Lachnospiraceae* (роды *Roseburia*, *Cellulosilyticum*, *Blautia* и др.), *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, которые, по данным метагеномных исследований, составляют большую долю кишечного микробиома млекопитающих [12]. Большинство из этих последовательностей не были идентифицированы. Важно отметить, что семейство *Lachnospiraceae* некоторыми исследователями предлагается в качестве альтернативного индикатора фекального загрязнения воды. Также в образцах обнаруживались единичные ОТЕ, принадлежащие к семействам *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, представители которых присутствуют в микробиоме кишечника, что может свидетельствовать о фекальном загрязнении исследуемых рек Приэльтонья.

Среди представителей филума *Bacteroidetes* были выявлены флотипы, принадлежащие к роду *Bacteroides* (6 ОТЕ — в р. Ланцуг, 7 ОТЕ — в р. Чернавка), которые наряду с обитанием в кишечнике могут выступать в качестве этиологического фактора «анаэробных» инфекций и также рассматриваются как возможный индикатор фекального загрязнения. Среди *Actinobacteria* был зарегистрирован флотип, близкий к *Mycobacterium paraense*, выделенной из образца легких.

Обращает на себя внимание присутствие большого числа флотипов, являющихся симбионтами простейших, таких как бактерии родов *Polynucleobacter*, *Neochlamydia*, *Parachlamydia*, семейства *Rickettsiaceae* и др., что свидетельствует о хороших условиях для формирования симбиотических связей между простейшими и бактериями в солоноватых континентальных водоемах и, возможно, о существенной роли протистов в персистенции патогенных и условно патогенных бактерий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных позволил выявить в планктоне солоноватых рек Приэльтонья бактерий организменного происхождения, в том числе и потенциально патогенных. Обнаруженные флотипы согласуются с многочисленными публикациями о регистрации патогенных микроорганизмов в морской воде, таких как *Vibrio* (нетоксигенные *V. cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus* и др.) [10], *Staphylococcus aureus* [8], псевдомонады и *Escherichia coli* [1].

Вероятным источником бактериального загрязнения солоноватых рек Приэльтонья является крупный и мелкий рогатый скот, о чем свидетельствует обнаружение в большом количестве в планктонных образцах представителей семейств *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Erysipelotrichaceae*, порядка *Bacteroidales*, составляющих большую долю нормальной микрофлоры кишечника, а также представителей рода *Arcobacter*, поражающих домашних животных и вызывающих диарею у людей, для которых была показана возможность водного пути передачи [5]. Вероятно, данные микроорганизмы попадают в воду непосредственно при выпасе скота, как наблюдается в среднем течении р. Ланцуг, или за счет дождевых стоков с прилегающих территорий, как происходит в реке Чернавка. Полученные результаты демонстрируют, что соленые континен-

тальные водоемы, наряду с пресными и морскими, выполняют резервуарную функцию для потенциально патогенных микроорганизмов. Рекреационное значение подобных водоемов и частое использование как курортной базы делает необходимым мониторинг их экологического и санитарного состояния.

Применение метода высокопроизводительного секвенирования открывает широкие возможности для преодоления существующих ограничений традиционных методов оценки микробиологической безопасности водных источников. Метод позволяет осуществлять прямую детекцию патогенов в образце, а не судить косвенно о возможном их присутствии по индикаторным видам; может применяться к образцам из самых различных объектов; позволяет обнаружить некультивируемые микроорганизмы и получить информацию о новых, неизученных или малоизученных видах, в том числе и патогенных. Все эти достоинства делают перспективным использование методов высокопроизводительного секвенирования для скрининговых исследований с целью оценки спектра потенциально патогенных микроорганизмов в водоеме. Однако, несмотря на преимущества, метод имеет ряд существенных недостатков и ограничений, так как обнаружение ДНК микроорганизмов не дает информации об их жизнеспособности, вирулентности и абсолютном содержании, а соответственно степени риска для населения. Длина последовательностей, расшифровать которые можно на платформе MiSeq, ограничена 550 н.п., что делает затруднительной идентификацию на уровне вида. Таким образом, необходимо совершенствование методических подходов к оценке качества воды, в том числе и в континентальных солоноватых водоемах, и расширение данных о микробном составе микроорганизмов различных биотопов с целью разработки алгоритмов оценки рисков здоровью человека из-за наличия патогенов в воде.

Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (Оренбурге) и частично поддержана грантами РФФИ №№ 16-44-560316 и 17-04-00135.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davies C.M., Long J.A.H., Donald M., Ashbolt N.J. Survival of Fecal Microorganisms in Marine and Freshwater Sediments. *Appl. Env. Microbiology*. 1995, 61 (5):1888-1896.
2. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010, 26 (19): 2460-2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
3. Figueras M. J., Latif-Eugenн F., Ballester F. et al. *Aeromonas intestinalis* and *Aeromonas enterica* isolated from human faeces, *Aeromonas crassostreae* from oyster and *Aeromonas aquatilis* isolated from lake water represent novel species. *New Microbe and New Infect.* 2017, 15: 74-76.
4. Gast R.J., Moran D.M., Dennett M.R. et al. Amoebae and *Legionella pneumophila* in saline environments. *J. Water Health*. 2011, 9(1): 37-52.
5. Girones R., Ferrus M.A., Alonso J.L. et al. Molecular detection of pathogens in water. The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*. 2010, 44: 4325-4339.
6. Han X.Y., Ihegword A., Evans S.E. et al. Microbiological and Clinical Studies of Legionellosis in 33 Patients with Cancer. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (7): 2180-2187.
7. Lastovica A.J., On S.L.W., Zhang L. The Family Campylobacteraceae. In: Rosenberg E. et al. (Ed.). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.
8. Levin-Edens E., Bonilla N., Meschke J. Scott et al. Survival of environmental and clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in marine and fresh waters. *Water Research*. 2011, 45: 5681-5686.
9. Micana-Galbis D., Farfón M., Gaspar Lorén J. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic Applied Microbiology*. 2010, 33: 15-19.

10. Ng C., Goh S.G., Saeidi N. et al. Occurrence of *Vibrio* species, beta-lactam resistant *Vibrio* species, and indicator bacteria in ballast and port waters of a tropical harbor. *Science of the Total Environment*. 2018, 610-611: 651-656.
11. Nováková D., Sedláček I., Pantucek R. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *J. Medical Microbiology*. 2006, 55: 523-528.
12. Rajilić-Stojanović M., de Vos W.M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014, 38 (5): 996-1047.
13. Ramnrez-Castillo F.Y., Loera-Muro A., Jacques M. et al. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. 2015, 4: 307-334.
14. Robins P.E., Skov M.W., Lewis Matt J. et al. Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuarine Coastal Shelf Science*. 2016, 169: 119-135.
15. Rose J.B., Epstein P.R., Lipp E.K. et al. Climate Variability and Change in the United States: Potential Impacts on Water and Foodborne Diseases Caused by Microbiologic Agents. *Environmental Health Perspectives*. 2001, 109 (suppl. 2): 211-221.

© Т.Н.ЯЦЕНКО-СТЕПАНОВА, М.Е.ИГНАТЕНКО, 2018

Т.Н.Яценко-Степанова, М.Е.Игнатенко

ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫЕ ЦАНОБАКТЕРИЯ ЛЕЧЕБНЫХ ГРЯЗЕЙ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург

Цель. Определение видового состава *Cyanobacteria* грязе-рапного участка реки Тузлукколь и выявление потенциально опасных представителей данной группы микроорганизмов. *Материалы и методы.* Исследовано 270 образцов (из них 135 количественные), отобранных в весенне-осенний период 2012-2017 гг. в соответствии с общепринятыми методиками. Идентификацию цианобактерий проводили согласно определителям отечественных и зарубежных авторов, для подсчета численности использовали камеру Нажотта объемом 0,01 см³, биомассу определяли расчетно-объемным методом. *Результаты.* Выявлено 25 видов, разновидностей и форм *Cyanobacteria*. Четыре рода (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* и *Lyngbya*) — потенциально способны продуцировать гепато-, нейро- и дерматотоксины. Общее количество цианобактерий в отдельные периоды превышало показатели, рекомендованные ВОЗ в водах для купания почти в 5 раз. *Заключение.* Результаты исследования доказывают необходимость систематического контроля *Cyanobacteria* (видовой состав и количественное развитие), без которого используемый населением в бальнеологических целях грязе-рапный участок не может считаться безопасным для здоровья людей.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 95—100

Ключевые слова: *Cyanobacteria*, токсины, автотрофные микроорганизмы, минерализация

T.N.Yatsenko-Stepanova, M.E.Ignatenko

POTENTIALLY DANGEROUS *CYANOBACTERIA* OF THERAPEUTIC MUD

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

Aim. Determination of *Cyanobacteria* species composition in the Tuzlukkol River part with mud and brine and identification of potentially dangerous representatives of this group of microorganisms. *Materials and methods.* 270 samples were analyzed (135 of them — quantitatively), selected in the spring-autumn periods 2012-2017 in accordance with generally accepted methods. Identification of cyanobacteria was carried out according to the algae identification guides of domestic and foreign authors, the chamber of Najotta with a volume of 0.01 cm³ was used to calculate the algae quantity. The algae biomass was calculated taking into account the

volume of the cells. *Results.* 25 species, varieties and forms of *Cyanobacteria* have been identified. Four genera (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* and *Lyngbya*) were potentially capable to produce hepato-, neuro- and dermatotoxins. In some periods the total number of cyanobacteria exceeded almost 5 times the standard recommended by WHO in bathing waters. *Conclusion.* The results of the study demonstrate the necessity of *Cyanobacteria* monitoring (species composition and quantity) to prove the mud safety for people health during balneotherapy.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 95–100

Key words: *Cyanobacteria*, toxins, autotrophic microorganisms, salinity

ВВЕДЕНИЕ

Сегодня одним из объектов пристального внимания токсикологов являются *Cyanobacteria* (=Суанопрокарйота, =Суанопхита). Это обусловлено способностью данной группы микроорганизмов продуцировать разнообразные токсины, представляющие реальную опасность как для обитателей водоемов, так и для человека [1, 2, 8, 10, 14]. К настоящему моменту среди цианобактерий выявлено свыше 50 потенциально токсигенных видов [2]. Они обнаружены по всему миру в большинстве озёр и водохранилищ [6 — 8, 10, 11].

Широкое распространение токсичных цианобактерий и их опасность для человека превратились в серьезную проблему, решение которой не ограничивается только изучением цианотоксинов, а требует практических действий, в том числе государственного и международного уровня. Для защиты здоровья населения от последствий, вызванных действием цианотоксинов, уже разработаны рекомендации ВОЗ и введён рекомендуемый ориентировочный уровень как к концентрациям отдельных токсинов (например, МС-LR: в питьевой воде не должна превышать 1 мкг/л, а в водах для купания — 2-4 мкг/л), так и количеству клеток — 20 млн цианопрокарйотных клеток/л в условиях доминирования *Cyanoprokaryota* [15]. Рассматривается эта проблема и в международных документах OECD [13]. Особо указано, что под контролем должны находиться не только источники питьевого водоснабжения, но и водоемы, имеющие рекреационное значение.

Одним из таких мест является грязе-рапный участок реки Тузлукколь (Оренбургская область), используемый населением для принятия минеральных и грязевых ванн в бальнеологических целях. Отсутствие информации о токсинопродуцирующих цианобактериях и бесконтрольное применение данного участка реки создают потенциальную угрозу здоровью людей.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось определение видового состава *Cyanobacteria* грязе-рапного участка реки Тузлукколь и выявление потенциально опасных представители данной группы микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили образцы (270, из них 135 — количественные), отобранные как на грязе-рапном участке реки (51°33' с.ш., 56°60' в.д.), так и в озерах-воронках, выкопанных населением в прирусловой зоне с целью принятия грязевых ванн. Грязе-рапный участок реки Тузлукколь имеет геологическое происхождение. Его образование связано с выходом на поверхность солей и гипсов кунгурского яруса нижней перми, по которым протекает река. Здесь же находятся минеральные источники (минерализация до 13,6 г/л) и две самоизливающиеся скважины (минерализация

26,2-168,6 г/л). Рекреационная нагрузка на исследуемый участок составляла в среднем около 30 человек в день.

Отбор проб проводили в весенне-осенний период с 2012 по 2017 гг. в соответствии с общепринятыми методическими подходами [9].

Идентификацию цианобактерий проводили согласно определителям отечественных и зарубежных авторов [1, 3, 5, 8, 12], для подсчета численности использовали камеру Нажотта объемом 0,01 см³, биомассу определяли расчетно-объемным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая физиологическая пластичность цианобактерий способствует их широкому распространению и возможности существования в самых различных местообитаниях [6]. Тем не менее, повышенное содержание солей в воде является фактором, создающим особые условия для жизни и ограничивающим видовое богатство. Вероятно, этим можно объяснить сравнительно низкое разнообразие Cyanobacteria (25 видов, разновидностей и форм) грязе-рапного участка реки Тузлукколь: *Anabaena Bergii* f. *minor* (Kissel.) Kossinsk. (= *Chrysoosporium minor* (Kiselev) Komárek); *Anabaena oscillarioides* Bory (= *Anabaena oscillarioides* Bory ex Boret et Flahault); *Anabaena variabilis* Kütz. ex Bornet et Flahault (= *Trichormus variabilis* (Kütz. ex Bornet et Flahault) Komárek et Anagn.); *Anabaena* spp.; *Gomphosphaeria lacustris* Chodat (= *Snowella lacustris* (Chodat) Komárek et Hindák); *Lyngbya aestuarii* (Mert.) Liebm. (= *Lyngbya aestuarii* Liebm. ex Gomont); *Lyngbya confervoides* Ag. (= *Lyngbya confervoides* Agardh ex Gomont); *Lyngbya cryptovaginata* Schkorb. (= *Planktothrix cryptovaginata* (Schkorbatov) Anagn. et Komárek); *Lyngbya limnetica* Lemm. (= *Planktolyngbya limnetica* (Lemm.) Kom.-Legn. et Cronb.); *Lyngbya* spp.; *Merismopedia punctata* Meyen; *Merismopedia tenuissima* Lemmerm.; *Nodularia harveyana* Thur. ex Bornet et Flahault; *Nodularia spumigena* Mert. ex Bornet et Flahault; *Oscillatoria amphibia* Agardh ex Gomont (= *Geitlerinema amphibia* (Agardh ex Gomont) Anagn.); *Oscillatoria angustissima* West et G.S. West (= *Jaaginema angustissimum* (West et G.S. West) Anagn. et Komárek); *Oscillatoria brevis* Kütz. ex Gomont (= *Phormidium breve* (Kütz. ex Gomont) Anagn. et Komárek); *Oscillatoria chalybea* f. *conoidea* V. Poljansk.; *Oscillatoria limosa* f. *constricta* Biswas (= *Oscillatoria limosa* Agardh ex Gomont); *Oscillatoria* spp.; *Snowella rosea* (Snow) Elenkin; *Spirulina major* Kütz. ex Gomont; *Spirulina subtilissima* Kütz. ex Gomont; *Synechocystis sallensis* Skuja; *Synechocystis parvula* Perfiliev.

Проведенный анализ литературных данных позволил выявить среди установленных цианопрокариот четыре рода автотрофных микроорганизмов, потенциально способных продуцировать гепато-, нейро- и дерматотоксины. Это *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia* и *Lyngbya*. Кроме того, все 25 видов обнаруженных цианобактерий обладают раздражающим эффектом за счет липополисахаридов (LPS) [2, 14]. В связи с этим, необходимо было проследить динамику количественных показателей, поскольку токсический эффект напрямую зависит от степени развития цианобактерий [7].

Установлено, что на изучаемом участке реки Тузлукколь характерной особенностью цианобактериального сообщества являлась большая пестрота состава и значительный разброс величин численности и биомассы автотрофных прокариот в разные сезоны и разные годы. На мелководных, хорошо прогреваемых участках весенняя вегетация Cyanobacteria начинается рано. Так, в начале мая 2014 г. при температуре воды в точке отбора проб 19°C количество синезеленых прокариот составляло уже 7,6 млн кл/л. за счет разви-

тия *O. angustissima*, *O. amphibia*, *L. limnetica*. В 2017 году значительного развития к концу мая достигли *A. variabilis* и *O. limosa* (0,7 млн кл/л). Напротив, максимальные показатели количественного развития *Cyanobacteria* в 2012 г. (92,1 млн кл/л, в основном за счет вегетации *L. limnetica*) и 2013 г. (15,8 млн кл/л — *O. angustissima*, *O. amphibia*, *L. limnetica*) были отмечены в середине октября. В отдельные периоды доля цианобактерий в составе сообщества автотрофных микроорганизмов исследуемого участка реки составляла 69,3 %, иногда они отсутствовали вовсе. В ряде случаев отмечалось формирование монодоминантных сообществ. Подобное явление наблюдалось в июле 2016 г., когда было зафиксировано массовое развитие *S. parvula* — 2,7 млрд кл/л при отсутствии других представителей автотрофных микроорганизмов.

Полученные данные соответствуют общебиологическим закономерностям: влияние уровня солености проявляется в экологическом подборе видов, адаптированных к экстремальным условиям, а количественное развитие является результатом сочетанного отклика сообщества на природно-климатические и антропогенные изменения условий среды.

На сегодняшний день изучению токсических свойств автотрофных прокариот посвящено значительное количество исследований [2, 4, 8, 10, 11, 14]. Установлено, что *Cyanobacteria* синтезируют широкий спектр веществ, обладающих гепатотоксичностью, иммунотоксичностью, нейротоксичностью, генотоксичностью и мутагенностью, эмбриотоксичностью, канцерогенностью, дерматотоксичностью [2, 10, 11, 14]. Контакт человека с цианотоксинами может происходить разными способами, и, в первую очередь, это попадание в организм с водой и наружно на кожу при использовании водных (и грязевых) процедур.

Проведенные нами исследования грязе-рапного участка реки Тузлукколь позволили выявить наличие 4 родов цианопрокариот, потенциально способных продуцировать токсины (таб.).

Токсины и токсинопродуцирующие рода *Cyanobacteria* грязе-рапного участка реки Тузлукколь (данные по цианобактериальным токсинам и их биологической активности приводятся по [2, 7, 10, 11, 14])

Цианобактериальные токсины	Биологическая активность	Токсинопродуцирующие рода
Гепатотоксины		
Микроцистины	Гепатотоксичность, ингибиторы протеинфосфатаз, нарушают целостность цитоплазматической мембраны, обладают канцерогенным эффектом	<i>Anabaena Oscillatoria</i>
Нодулярины		<i>Nodularia</i>
Цилиндро-спермопсин	Гепатотоксичность, цитотоксичность. Некротические повреждения печени, почек, селезенки, легких, кишечника; ингибитор синтеза белка	<i>Anabaena</i>
Нейротоксины		
Анатоксин-а, Гомоанатоксин-а	Ингибитор ацетилхолинэстеразы	<i>Anabaena Oscillatoria</i>
Анатоксин-а(с)	Ингибитор ацетилхолинэстеразы	<i>Anabaena</i>
Сакситоксины	Блокируют нервные волокна, ингибируя натриевые каналы и выделение ацетилхолина	<i>Anabaena_Lyngbya Oscillatoria</i>
Дерматотоксины		
Дерматотоксины (аплисиатоксин, лингбиатоксин)	Активаторы протеинкиназы С. Способствуют возникновению острых дерматитов, а также воспалению кишечного тракта	<i>Lyngbya Oscillatoria</i>
Эндотоксины		
Ирритантные токсины (липополисахариды)	Ирритантный эффект. LPS пирогенны и токсичны, могут вызывать кожные раздражающие и аллергические реакции у людей и животных	Все <i>Cyanobacteria</i>

Поскольку исследуемый участок реки используется населением в качестве минеральных и грязевых ванн, следует обратить особое внимание на потенциально опасные *Cyanobacteria*, продуцирующие дерматотоксины — это *Lyngbya* и *Oscillatoria*, количество которых в отдельные периоды превышало показатели, рекомендованные ВОЗ [15] в водах для купания почти в 5 раз. Синтезируемые ими аплисиатоксин и лингбиатоксин являются активаторами протеинкиназы С и вызывают острые дерматиты.

Безусловно, не все популяции вышеназванных цианопрокариот способны синтезировать токсины: токсигенность — свойство отдельных штаммов, а не вида в целом [2, 14]. Но следует учесть, что все виды обнаруженных цианобактерий за счет LPS обладают еще и раздражающим эффектом. LPS являются эндотоксинами и входят в состав оболочки грамотрицательных бактерий (в том числе *Cyanobacteria*), где формируют комплексы с белками и фосфолипидами. Они пирогенны и токсичны; могут вызывать кожные раздражающие и аллергические реакции у людей [2, 14]. В итоге, само явление массового развития *Cyanoprokaryota* этого участка реки несет потенциальную угрозу здоровью населения. На данный момент положение спасает то, что значительное развитие цианобактерий на исследуемом участке чаще всего происходит в мае и октябре, вне сроков купального сезона, благодаря чему возможность подвергнуться токсическому воздействию минимальна; удаленность — от ближайшего населенного пункта участок располагается в 9,5 км. Но ситуация в скором времени может измениться из-за популяризации средствами массовой информации минеральных грязей бальнеологического качества реки Тузлукколь.

Таким образом, очевидна необходимость систематического контроля видового состава и количественного развития цианотпрокариот грязе-рапного участка реки Тузлукколь. Без мониторинга потенциально опасных токсипродуцирующих цианобактерий используемый населением в бальнеологических целях данный водный объект не может считаться безвредным для здоровья людей.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИКВС УрО РАН «Разнообразие и функционирование симбионтных микробных сообществ водоемов с различной минерализацией».

ЛИТЕРАТУРА

1. Водоросли, вызывающие «цветение» водоемов Северо-Запада России. М., Тов-во науч. изд. КМК. 2006.
2. Волошко Л.Н., Пиневиц А.В. Разнообразие токсинов цианобактерий. Астраханский вестник экологического образования. 2014, 1 (27): 68-80.
3. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Синезеленые водоросли. М., Госиздат, 1953.
4. Калинникова Т.Б., Гайнутдинов М.Х., Шагидуллин Р.Р. Цианотоксины — потенциальная опасность для пресноводных экосистем и здоровья человека. Российский журнал прикладной экологии. 2017, 2: 3-19.
5. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Хоулта Дж., Крига Н., Снита П. и др. 1997.
6. Охупкин А.Г., Воденеева Е.Л., Бондарев О.О. Видовой состав *Cyanoprokaryota* планктона Чебоксарского водохранилища (Нижегородская обл., Россия). Альгология. 2015, 25(3): 265-277.
7. Патова Е.Н. Цианопрокариотическое «цветение» водоёмов восточноевропейских тундр (флористические и функциональные аспекты). Теоретическая и прикладная экология. 2007, 3: 4-10.

8. Рябушко Л.И. Атлас токсичных микроводорослей Черного и Азовского морей. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2003.
9. Садчиков А.П. Методы изучения пресноводного фитопланктона. М., 2003.
10. Apeldoorn M.E., Egmond H.P., Speijers G.J.A. et al. Toxins of cyanobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51: 7-60.
11. Jungblut A.D., Neilan B.A. Molecular identification and evolution of the cyclic peptide hepatotoxins, microcystin and nodularin, synthetase genes in three orders of cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 2006, 185(2): 107-114.
12. Komárek J., Anagnostidis K., Cyanoprokaryota I. Chroococcales. Cyanoprokaryota. II. Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa. 19(1)-19(2). Jena, Heidelberg, 1998.
13. OECD. Emerging Risks to Water Supplies: Best Practice for Improved Management and Preparedness to protect Public Health. 2005. Available at www.oecd.org/sti/biotechnology.
14. Sivonen K. Cyanobacterial toxins. *Encyclopedia of microbiology.* (Ed. M. Schaechter). Oxford: Elsevier, 2009.
15. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality Vol. 1 Third edition. WHO. Geneva, Switzerland, 2004.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

В.И.Капков, С.Г.Васильева, Е.С.Лобакова

СУКЦЕССИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ В ВОДОЕМАХ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

В экспериментах *in situ* исследовались сезонные сукцессии цианобактерий, вызывающих «цветение» воды в водоемах бореальной зоны в зависимости от экологических факторов. Установлено, в планктонную стадию развития основными факторами, обуславливающими рост и смену доминирующих форм цианобактерий, являются температура воды, уровень солнечной радиации и выделяемые метаболиты. Наиболее выраженные «цветения» воды с высоким накоплением биомассы и вторичных токсичных метаболитов цианобактерий наблюдаются в годы с антициклональным типом погоды. В такие годы цианобактерии проявляют максимальный рост благодаря выработанному в процессе эволюции сочетанию адаптивных признаков, комбинации которых отсутствуют у партнеров по планктонному сообществу или встречаются лишь по отдельности. Вероятно, что способность цианобактерий занимать различные биотопы в результате высокой устойчивости к климатическим факторам и ожидаемое глобальное потепление будут стимулировать более продолжительные и токсичные «цветения» воды в водоемах бореальной зоны.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 100—107

Ключевые слова: цианобактерии, «цветение» воды, сукцессии, экологические факторы, метаболиты, глобальное потепление

V.I.Kapkov, S.G.Vasilieva, E.S.Lobakova

SUCCESSION OF CYANOBACTERIA IN BOREAL WATERS

Lomonosov Moscow State University, Russia

The *in situ* investigation of cyanobacterial seasonal succession, causing algal «blooms» in boreal waters, and its dependence on ecological factors was fulfilled. It was revealed that the most important abiotic factors promoting the growth and changes of dominant species in populations are the water temperature, the level of solar radiation and content of cyanobacterial metabolites. The most profound «blooming» with highest biomass and toxic metabolites accumulation occurs during anticyclone type of weather. During such periods cyanobacteria are the most prevalent

cultures due to the combination of adaptive mechanisms acquired in evolutionary process which other partners of planktonic community lacked or deprived. It was hypotized that the global warming and cyanobacteria ability to inhabit different biotopes due to environmental tolerance would result in more profound and prolonged «blooming» of boreal waters.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), No. 4, P. 100—107

Key words: cyanobacteria, algal blooms, succession, ecological factors, metabolites, global warming

ВВЕДЕНИЕ

В водоемах бореальной зоны наблюдаются повторяющиеся из года в год сезонные сукцессии планктона, которые выражаются в появлении, кроме весеннего и осеннего, летнего максимума за счет массового развития цианобактерий (Цб) родов *Dolichospermum* (=Anabaena) — *Aphanizomenon* — *Microcystis*. В годы с антициклональным типом погоды при повышенном уровне солнечной радиации существенно увеличивается биомасса популяций Цб и доля токсичных «цветений» воды [21]. Резкие «вспышки» численности и доминирование Цб в эвфотической зоне сопровождается снижением видового разнообразия планктонного сообщества.

Планктонные стадии развития Цб привлекают внимание исследователей в связи с участвовавшими в последнее время случаями отравления водной среды токсичными метаболитами, выделяемыми Цб прижизненно и после разрушения клеток [7, 14]. Следует подчеркнуть, что «цветение» вызывают обычно нитчатые или колониальные формы с высокой удельной поверхностью клеток (S/V), с хорошо развитыми поверхностными структурами (слизистые чехлы, капсулы). Обычно это теплолюбивые организмы, более требовательные к температуре воды, чем к уровню освещенности, с относительно высокой скоростью деления клеток, устойчивые к поеданию организмами зоопланктона из-за слизистых поверхностных структур, с большим запасом фосфора в клетках, аккумулированного во время бентосной стадии развития и потенциальной способностью увеличивать рост популяции за счет покоящихся вегетативных спор.

К числу наиболее распространенных видов, вызывающих токсичные «цветения» относятся *Dolichospermum flos-aquae* (Lyngb.) Breb.ex Born.et Flah. Wackl.Hoffm. (Syn.: *Anabaena flos-aquae* Elenk.), *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs, *Microcystis aeruginosa* f. *aeruginosa* Elenk. и *M.aeruginosa* f. *flos-aquae* (Wittr.) Elenk. Среди вторичных метаболитов, продуцируемых этими видами наиболее опасными для гидробионтов и человека являются алкалоиды-нейротоксины (анатоксин-а, анатоксин-а(s), гомоанатоксин-а) ингибиторы ацетилхолинэстеразы и сакситоксин — блокатор натриевых каналов клетки. Не меньшую опасность представляют циклические пептиды — гепатотоксины (микроистины) — ингибиторы протеинфосфатаз и обладающие также канцерогенными свойствами. Некоторые Цб синтезируют низкомолекулярные физиологически активные вещества: криптофицин, микровиридин, эругинозин, анабенопептины, микрогинины и другие метаболиты, которые регулируют рост собственной популяции во время «цветения», а также ингибируют развитие водорослей, беспозвоночных и рыб [10, 19].

Планктонные Цб демонстрируют широкую экофизиологическую адаптацию к изменяющимся условиям среды и способность давать «вспышку» чис-

ленности практически во всех водных экосистемах. Они заняли практически все экотопы, вступая в симбиотические отношения с микро- и макроводорослями, беспозвоночными животными, грибами и высшими растениями. В свою очередь, в клетках Цб обитают цианофаги, а на поверхности гетероцист — бактерии [15]. Максимальный рост Цб в водоемах, вызывающих «цветение» воды, осуществляют в составе альгобактериальных ассоциаций [18].

До настоящего времени остаются неясными основные экологические факторы, обуславливающие активный рост Цб во время «цветения» водоемов. Поэтому выяснение особенностей развития потенциально токсичных Цб в природных экосистемах будет способствовать выяснению роли приоритетных экологических факторов, влияющих на уровень «цветения» и, соответственно, на синтез метаболитов с различной физиологической активностью. Эксперименты *in situ* помогут разработать также способы управления ростом популяций Цб как в условиях естественного местообитания, так и при использовании их в лабораторных опытах.

В этой связи, нами была предпринята попытка исследования цикла развития и структуры популяции возбудителей «цветения» воды *D. flos-aquae*, *Aph. flos-aquae* и *Microcystis aeruginosa* в водоемах бореальной зоны в зависимости от основных экологических факторов, определяющих массовое развитие этой ЦБ в планктонном сообществе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на водохранилищах Можайском (55°02'18" с.ш., 37°45'20" в.д.) и Canyon Ferry Lake (46°30'23" с.ш., 111°36'24" з.д., Montana, USA) летом 2010-2014 годов. Пробы планктона отбирали в полдень батометром Рутнера объемом 2 л с различных горизонтов в разных точках водоема в течение вегетационного периода. Часть пробы фиксировали раствором Люголя с добавлением формалина и ледяной уксусной кислоты и концентрировали методом обратной фильтрации. Вторую часть пробы последовательно фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 5 и 1,2 мкм для последующего измерения линейных параметров клеток. Количество ЦБ в пробах просчитывали под микроскопом в камере Нажотта объемом 0,05 см³. Биомассу находили расчетным методом, приравнивая форму клеток к объему соответствующей геометрической фигуры и принимая в расчет, что 10³ мк³ составляет 0,001 мг сырой массы. Биомассу мелких колониальных видов определяли по количеству хлорофилла, принимая в расчет содержание хлорофилла «а» в сухом веществе равным 2,5% [9]. Пигменты экстрагировали 90% водным раствором ацетона при 4 °С в условиях затемнения после разрушения клеток в стеклянном гомогенизаторе. Содержание феофитина «а» определяли по изменению оптической плотности вытяжки пигментов при 430, 665 и 750 нм, добавляя в кювету 0,1 мл 0,1 N соляной кислоты после измерения хлорофилла. Концентрацию фосфатов и нитратов в воде определяли методом ионной хроматографии высокого разрешения (HPLC). Электронные импульсы регистрировали с помощью интегратора Perkin Elmer LCI-100. Температуру воды на разных глубинах водоема измеряли с использованием электродных датчиков. Прозрачность воды определяли по диску Секки. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Microsoft Excel» и «STATISTICA» 5.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цианобактериальному «цветению» изученных водоемов всегда предшествовало доминирование в планктоне эвфотической зоны диатомовых водорослей *Asterionella formosa* Hass., *Fragilaria crotonensis* Ritt. *Navicula digitoradiata* (Greg.) A.S., развитие которых приводило к существенному снижению запасов в воде основных биогенных элементов, особенно азота и фосфора.

В период весенней гомотермии поднятые со дна конвективными потоками проросшие акинеты и гетероцистосодержащие трихомы Цб длиной 50–70 мк в большом количестве обнаруживались в планктонных пробах. Интенсивный рост численности и прирост биомассы *D. flos-aquae* наблюдался в начале лета с прогревом поверхностного слоя воды до 16–18 °С и снижением в ней концентрации нитратов в 2, а фосфатов — в 1,5 раза (табл. 1).

На фоне лимитированного содержания в воде азота и фосфора преимущество в росте получали популяции diaзотрофных миксотрофных Цб с высокой скоростью деления клеток в трихомах. Высокая степень приспособленности к дефициту биогенных элементов у Цб IV субсекции связана со способностью использовать для роста как накопленный клетками в виде цианофициновых гранул (сополимер аргинина и аспарагиновой кислоты) резервный азот, так и фиксировать его в аэробных условиях специализированными клетками гетероцистами. Установлено, что для Цб характерно видовое предпочтение к определенным формам азота, что обеспечивает им последовательное доминирование при развитии в планктоне. Следует отметить, что при переходе с нитратного на аммонийный азот у *Aph. flos-aquae* возрастает эффективность использования энергии клетками [13]. Так, массовое развитие *D. flos-aquae* в водоеме сопровождается использованием нитратного азота, а рост *Aph. flos-aquae* — аммонийного азота. Эти виды Цб в цикле развития формируют специализированные спороподобные клетки акинеты, которые позволяют переживать им неблагоприятные условия. Акинеты являются транзиторной формой дифференциации клеток у Цб, и процесс их образования сопровождается накоплением большого количества связанного азота (цианофициновых гранул), фосфора в виде полифосфатов и гликогена. В связи с этим при благоприятной температуре они быстро могут перейти к массовому развитию. Определяющими в этом случае факторами массового развития Цб становятся абиотические факторы — температура воды и уровень солнечной радиации.

В стратифицированном водоёме в эвфотической зоне Цб получают конкурентное преимущество в росте по сравнению с другими организмами планктонного сообщества. Поэтому в начале лета в планктоне доминирует *D. flos-aquae* с невысоким требованием к интенсивности света и оптимальной температурой роста 16–18 °С. «Цветение» водоема, вызванное *D. flos-aquae*, продолжается

Таблица 1. Содержание соединений азота и фосфора в эвфотической зоне Canyon Ferry Lake (мкг/л) летом 2010 года

Биогенные элементы	Время отбора проб воды				
	20.04	20.05	20.06	20.07	20.08
NO ₃ ⁻	520,3±61,4	280,4±39,6	161,5±21,4	153,8±25,7	96,7±14,8
NH ₄ ⁺	240,5±32,3	210,4±30,4	375,6±41,5	563,1±71,4	190,8±28,6
PO ₄ ³⁻	61,8±11,3	50,7± 9,8	41,3± 8,5	35,5± 6,2	27,6± 5,4
P общий	168,4±22,5	152,2±23,1	136,8±18,0	120,7±16,3	128,6±15,7

около трех недель и заканчивается быстрым, в течение нескольких часов лизисом клеток. Причиной лизиса, по-видимому, является наличие в клетках ферментного комплекса, способного расщеплять пептидогликан клеточной стенки, который выделяется в среду во время разрушения клеточных оболочек [4], или наличием в составе популяции видоспецифического цианофага.

При старении популяции Цб в конце «цветения» одним из процессов автолиза клеток может быть также фотоокисление, которое сенсibiliзирует хлорофиллом, поэтому на стадии стационарной фазы роста популяции, когда происходит деградация хлорофилла, сопровождающаяся разрушением мембран тилакоидов, происходит автолиз клеток [8]. Анализ проб на содержание фотосинтетических пигментов в конце фазы «цветения», когда биомасса фитопланктона на 85-90% была представлена Цб, показал уменьшение концентрации хлорофилла «а» в 3 раза по сравнению с пиком «цветения» на фоне увеличения доли феофитина «а» [5].

Некоторые вещества, выделяемые в среду после лизиса клеток доминирующего вида, могут быть использованы в качестве источника питания видами Цб, способными к мезотрофному типу обмена. В результате в планктонном сообществе создаются благоприятные условия для асинхронных сезонных сукцессий планктонных стадий Цб, когда лизис клеток одного вида создает среду для роста других Цб, которые приходят на смену ранее доминирующему «цветущему» виду.

С ростом солнечной радиации и дальнейшим прогревом воды до 20-22 °С преимущество в развитии получает *Aph. flos-aquae*, для роста которой необходима высокая интенсивность солнечного света, поскольку в процессе роста прямые или изогнутые длинные трихомы данной Цб собираются в довольно крупные пучки или клубки. Необходимо отметить, что период «цветения» воды, обусловленный интенсивным развитием *Aph. flos-aquae*, совпадает с началом развития одноклеточной Цб I субсекции условно токсичной Цб *M. aeruginosa*, колонии которой постоянно присутствовали в планктонном сообществе. Однако интенсивный рост популяции *M. aeruginosa* начинался лишь после спада развития *Aph. flos-aquae*. «Вспышка» численности *M. aeruginosa* приходится на начало августа, когда температура воды достигает 24-25 °С, а инсалиция начинает снижаться. Развитие популяций *M. aeruginosa*, как правило, сопровождалось подавлением роста *Aph. flos-aquae*, что, по-видимому, связано с выделением в среду *M. aeruginosa* метаболитов, подавляющих развитие *Aph. flos-aquae* (табл.2). Аналогичные сукцессии планктонных стадий развития Цб наблюдались во время «цветения» воды в Можайском, Рыбинском, Горьковском и других водохранилищах бореальной зоны, особенно в годы с антициклональным типом погоды [6, 7].

Таблица 2. Изменение биомассы Цб в период «цветения» воды в Саунон Ferry Lake в 2010 г. (мкг/м³ сух. в-ва)

Время отбора проб	<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>
15.06	270,2±24,7	—	—
20.06	632,4±51,6	—	—
25.06	941,6±62,3	80,5±9,6	—
30.06	1240,5±115,4	187,7±16,4	—
05.07	652,3±49,0	306,9±27,5	110,7±11,8
10.07	106,0±12,5	710,3±53,2	214,3±19,5
15.07	—	1130,4±120,0	253,1±21,4
20.07	—	1390,0±146,2	398,6±43,2
25.07	—	1505,6±138,8	593,5±54,0
30.07	—	1218,2±110,0	817,2±63,5
05.08	—	704,5±55,4	1045,3±82,4
10.08	—	275,8±26,3	1152,0±89,6
15.08	—	195,2±18,7	1230,5±120,8

Примечание. — Менее 50 мкг/м³

Данные виды Цб относятся к условно токсичным видам и способны синтезировать и накапливать в клетках разные группы токсических метаболитов. У *Aph. flos-aquae* обнаружен гепатотоксин — цилиндропермозин и два нейротоксина: анатоксин-а и гомоанатоксин-а; у *M. aeruginosa* из гепатотоксинов выявлены микроцистины и не обнаружен ни один из структурных вариантов нейротоксинов. Наиболее полный набор токсичных метаболитов синтезирует *D. flos-aquae*: гепатотоксины — микроцистин и цилиндропермозин, а среди нейротоксинов — анатоксин-а, гомоанатоксин-а, анатоксин-а (с) и сакситоксины [2].

При смене доминирующего вида происходит деградация клеток ранее «цветущего» вида, и в окружающую среду вместе с токсичными метаболитами выделяются соединения азота, фосфора и других биогенных элементов, которые служат питательными веществами для популяции следующего за ним вида Цб. Поэтому даже во время пика «цветения» воды в планктонном сообществе на протяжении сукцессии присутствовали другие виды, в том числе Цб, диатомовые водоросли и простейшие.

В это же время наблюдалось интенсивное спорообразование и переход «цветущего» вида Цб к бентосной стадии развития в иловых отложениях водоема, где акинеты могут находиться несколько месяцев и даже лет [9]. Таким образом, развитие планктонных стадий Цб в сообществе регулируется совокупностью абиотических и биотических факторов, каждый из которых популяция стремится использовать, регулируя рост собственной численности, поскольку каждая популяция в составе сообщества всегда стремится поддерживать оптимальную плотность, обеспечивающую существование вида в среде, созданной и партнерами по биотическому сообществу.

При этом три основные группы экологических факторов обуславливают эффективный рост популяций Цб, вызывающих «цветение» воды в планктонном сообществе. К первой группе относится антропогенное увеличение концентрации биогенных элементов, способствующее интенсивному «цветению» воды, повторяющееся из года в год в водоемах умеренной зоны в результате интенсивного роста Цб. Массовому развитию Цб способствуют также различные потребности планктонных стадий в разных формах азота и фосфора, а также способность *D. flos-aquae* к азотфиксации атмосферного азота и запасам в клетках полифосфатов [16, 20].

Вторая группа абиотических факторов, обуславливающая активный рост Цб, связана с высоким уровнем геомагнитной активности и солнечной радиации в годы с антициклональным типом погоды [3]. В такие годы существенно возрастает частота «вспышек» численности Цб на фоне резкого увеличения токсичных «цветений». При высоком уровне солнечной активности рост биомассы Цб сопровождается увеличением биосинтеза токсичных метаболитов [11, 12, 17].

Особый интерес представляет третья группа факторов, связанная с выделяемыми Цб во внешнюю среду метаболитами, которые выполняют в планктонном сообществе специфические функции: регулируют клеточный цикл и рост собственной популяции, особенно на конечной стадии «цветения», ингибируют развитие партнеров по сообществу, вызывая элиминацию чувствительных видов. Поскольку в водных экосистемах обмен информацией между особями популяции и межпопуляционные взаимоотношения происходят посредством метаболитов, выделяемых в окружающую среду, то рост численности отдельного вида Цб и последующее отмирание в конце «цветения» сопровождается резким выбросом в среду высоких концентраций вторичных токсичных соединений. В результате в планктонном сообществе происходит нарушение информационного поля, которое приводит к разбалансировке

связей между партнерами и последующему изменению структуры биотического сообщества и смене доминирующего вида [1, 6].

Доминирование отдельных видов в летнем комплексе планктонного сообщества происходит благодаря способности Цб осуществлять максимальный рост и обусловлено тем, что в процессе эволюции при формировании жизненных стратегий у них появились свойства, которые сложились в сложную комбинацию приспособительных признаков, каждый из которых у других видов в сообществе присутствует лишь по отдельности. В то же время, резкое увеличение численности и биомассы «цветущего» вида Цб нарушает функциональное равновесие в планктонном сообществе и упрощает его структуру, что вызывает обострение конкуренции между партнерами за ресурс в результате доминирования отдельных популяций.

Можно предположить, что прогнозируемое изменение климата в сторону глобального потепления будет способствовать более продолжительным и токсичным «цветениям» воды планктонными стадиями развития эндемных и космополитных видов Цб, включая и теплолюбивые виды Цб, ранее массово не развивавшихся в исследуемых регионах, таких, как *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolozynska) Seenaya et Subba Raju в результате инвазии из южных регионов, как это происходит в годы с антициклональным типом погоды в водоемах бореальной зоны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки России (соглашение № 14.616.21.0080).

ЛИТЕРАТУРА

1. Винберг Г.Г. Особенности водных экологических систем. Журн. общ. биол. 1967, 28(5): 538-545.
2. Волошко Л.Н., Плющ А.В., Титова Н.Н. Токсины цианобактерий (Cyanobacteria, Cyanophyta). Альгология. 2008, 18 (1): 3-20.
3. Девяткин В.Г., Клайн Б.И., Шихова Н.М. О связи некоторых экосистем Рыбинского водохранилища с активностью магнитного поля Земли. Биология внутренних вод. 2004, 2: 53-60.
4. Ермакова Л.Р., Никитина К.А., Гусев М.В. Возрастные изменения ультраструктуры клеток *Anabaena variabilis*. Микробиология. 1997, 46 (2): 324-328.
5. Капков В.И., Александер Г., Александер М. «Цветение» воды синезелеными водорослями в Каньоне Ферри Лейк. Эколого-физиологические исследования водорослей и их значение для оценки состояния природных вод. Ярославль., Изд-во РАН Борок, 1996.
6. Капков В.И., Лихачева Н.Е., Фёдоров В.Д. Функциональные стратегии синезеленых водорослей и «цветение» воды. Бюллетень МОИП. 2009, 114 (3): 411-417.
7. Корнева Л.Г., Соловьева В.В. Фитопланктон и содержание цианотоксинов в Рыбинском, Горьковском и Чебоксарском водохранилищах в период аномально жаркого лета 2010 года. Вода: химия и экология. 2014, 8: 24-29.
8. Погосян С.И. Состояние растительных организмов в природных условиях и окислительное повреждение фотосинтетического аппарата. Дис. д-ра биол. наук. М., 2003.
9. Сиренко Л.А. Физиологические основы размножения синезеленых водорослей в водохранилищах. К., Наук. думка, 1972.
10. Федоров В.Д., Капков В.И. Руководство по гидробиологическому контролю качества природных вод. М., Изд-во МГУ, 2000.
11. Carmichael W.W. The Cyanotoxins. Adv. Bot. Res. 1997, 27: 211-256.
12. Paerl H.W. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge, Univ. Press, 1986.
13. Paerl H.W. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along freshwater-marine continuum. Adv. Exp. Ved. Biol. 2008, 619: 216-241.
14. Paerl H.W., Huisman J. Climate change — Blooms like is hot. Science. 2008, 320: 57-58.
15. Pearl H.W., Huisman J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. Environmental Microbiology Reports. 2009, 1(1):27-37.

16. Reynolds C.S. What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status. *Hydrobiologia*. 1998, 369/370: 11-26.
17. Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*. 1997 (35): 12-24.
18. Stomp M., Huisman J., Voros L. et al. Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 2007 (10): 290-298.
19. Skulberg O.M. Toxin produced by cyanophytes in Norwegian island waters — health end environment. Chemical data a basis of geomedical investigation. Oslo, Norv. Inst. Water Res., 1996.
20. Tilman D., Kiesling D., Sterner R. et al. Green, bluegreen and diatom algae: taxonomic difference in competitive ability for phosphorus, silicon and nitrogen. *Arch. Hydrobiol.* 1986, 106 (4): 473-485.
21. Wiedner C., Rucker J., Brüggemann R., Nixdorf B. Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*. 2007, 152: 437-484.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Т.Н.Шапиро¹, Г.А.Дольникова¹, Н.В.Немцева², Д.А.Санджиева³, Е.С.Лобакова¹

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСОРЦИУМА УГЛЕВОДОРОД ОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ НЕФТИ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

¹Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова; ²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ³Российский государственный университет нефти и газа им. И.М.Губкина, Москва

Из реактивного топлива ТС-1 выделен консорциум микроорганизмов, каждый член которого способен последовательно деградировать разные фракции углеводородов. Изолировано и идентифицировано 5 штаммов окисляющих углеводород бактерий (УОБ). Определены их физиолого-биохимические особенности. Все штаммы проявляют положительную каталазную активность. Установлено, что все штаммы УОБ, продуцирующие экзогенные и эндогенные поверхностно активные вещества, способны к росту на средах с разными фракциями углеводородов. Изучение подобных ассоциаций позволяет создавать эффективные препараты для биоремедиации при ликвидации аварийных разливов нефти и нефтепродуктов.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 107—113

Ключевые слова: нефть, нефтепродукты, углеводород окисляющие бактерии, углеводороды, консорциум микроорганизмов

T.N.Shapiro¹, G.A.Dolnikova¹, N.V.Nemtseva², D.A.Sandzhieva³, E.S.Lobakova¹

IDENTIFICATION AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A CONSORTIUM OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA OF OIL AND OIL PRODUCTS

¹Lomonosov Moscow State University; ²Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ³Gubkin Russian State University of Oil and Gas, Moscow, Russia

A consortium of microorganisms were isolated from TC-1 fuel form, each member of which is capable of consistently degrade hydrocarbons' different fractions. The 5 strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria (PSB) were identified and isolated from TS-1 jet fuel. Their physiological and biochemical features are defined. All strains exhibit positive catalase activity. It is determined that all UOB strains, producing exogenous and endogenous surfactants, are capable to growth on media with

different fraction of hydrocarbons. The study of these associations allows to create effective preparations for bioremediation in the elimination of accidental spills of oil and petroleum products.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 107—113

Key words: oil, petroleum products, hydrocarbon oxidizing bacteria, hydrocarbons, consortium of microorganisms

ВВЕДЕНИЕ

Изучение особенностей биологического окисления углеводородов нефти микробными сообществами необходимо как для решения фундаментальных задач микробиологии, биохимии, экологии, так и для практического применения в области биотехнологии. Биотехнологический подход к переработке нефти позволяет устранять результаты загрязнений нефтепродуктами почвы и воды, облегчать процессы ее добычи и переработки и получать нефтепродукты, легко утилизируемые микроорганизмами [9].

Известно, что решающую роль в трансформации нефти и нефтепродуктов (Н и НП) до простых соединений выполняют микроорганизмы [6, 22]. Установлено, что не менее 79 родов бактерий, 9 родов цианобактерий, 103 рода грибов и 14 родов водорослей способны использовать нефть и ее производные в качестве единственного источника углерода и энергии [19].

Разнообразие микроорганизмов, способных к утилизации Н и НП, обусловлено высокой конкуренцией и большим количеством путей деградации различных их фракций [13]. Микроорганизмы обладают свойством избирательного отношения к различным углеводородам. Эта способность определяется различием в количестве углеродных атомов в молекуле и особенностью структуры углеводорода. В природных условиях микроорганизмы образуют консорциумы, составляя единую цепь окисления углеводородов Н и НП. Каждый из микроорганизмов консорциума, обладая специфичными ферментными системами, направленными на использование определенного субстрата (как самих углеводородов, так и их производных), использует данный субстрат в своем метаболизме. Поэтому при совместном воздействии микроорганизмов консорциума происходит извлечение как большего количества, так и более широкого спектра углеводородов Н и НП.

Целью данной работы было изучение консорциума углеводород окисляющих бактерий (УОБ) реактивного топлива ТС1, а также морфологических, физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов УОБ, определение их субстратных предпочтений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали штаммы УОБ, выделенные из образца реактивного топлива (ТС1). Для выделения микроорганизмов использовали стандартные накопительные микробиологические среды, содержащие природные органические добавки — «универсальная среда» (УС), УС10 (разбавленная в 10 раз УС) [7] и среда Эванса (СЭ) [17]. Для выделения культур УОБ использовали среду Эванса минеральную (ЭМ) и среду по ГОСТ 9.023-74 (СГ) (1974), в которые добавляли сырую стерильную нефть средней плотности ($\rho=0,870$ г/см³).

Выделение УОБ проводили путем внесения 0,025 мкл исследуемого образца топлива на чашки Петри с плотными (2% агара) средами при комнатной

температуре. Учет колоний УОБ проводили на 4-7 сутки путем подсчета общего числа КОЕ, выросших на средах. Чистые культуры УОБ из полученных колоний микроорганизмов получали методом предельных разведений [4]. Поддержание выделенных бактериальных культур осуществляли на среде УС10.

Микроскопический контроль полученных чистых культур УОБ и определение их морфологических характеристик проводили на световом микроскопе Leica DM 2500.

Идентификацию полученных штаммов УОБ проводили с помощью секвенирования по 16S рРНК с использованием универсальных бактериальных праймеров.

Выделение геномной ДНК проводили из полученных суточных культур с помощью набора Thermo Scientific TMMag JETTM Plant Genomic DNA Kit. Фрагмент гена 16S рНК амплифицировали с помощью пары праймеров 16Suni27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGGCTCAG-3') и 16Suni907R (5'-CCGTCGAATTCCTTAGTTT-3'), где М = А или С, а К = А или G [21] в полимеразно-цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия). Качество полученных образцов ДНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 2,5% в агарозном геле с этидием бромидом. Очистку ПЦР продукта проводили с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование ПЦР продукта проводили на приборе ABI Prizm 3730 (Applied Biosystems). Чтение последовательностей нуклеотидов проводили в двух направлениях. Сравнительный анализ и поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных соответствующим последовательностям изучаемых штаммов, проводили в базе данных GenBank с помощью программного пакета BLAST [15].

Культуральные и физиолого-биохимические свойства микроорганизмов проверяли согласно методикам, описанным в [4] и определителю бактерий Берджи [10].

Эмульгирующую активность определяли визуально согласно методике [23], а также методом Купера и Голденберга [16] по определению индекса эмульгирования. Для этого в мерные пробирки объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл исследуемой жидкости и перемешивали в течение 2 мин на вортексе (Vortex V-1 plus, Biosan, Latvia). Индекс эмульгирования рассчитывали спустя 24 ч как отношение объема плотной эмульсии ($V_{\text{э}}$, мл), образуемой при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объему раствора (V , мл), умноженное на 100%: $E_{24} = V_{\text{э}}/V \cdot 100\%$, где $V = 10$ мл. Контролем служила стерильная питательная среда.

Измерение показателя поверхностного натяжения проводили методом Вильгельми [14]. Измерения проводили в супернатанте исследуемой культуры при 20°C на тензиометре, представляющим собой торсионные весы ВТ-500 с подвешенной алюминиевой пластиной. Поверхностное натяжение рассчитывали по формуле: $\sigma = mg/2l$, где m — масса отрыва пластины, г (среднее из трех измерений); $g = 9,8 \text{ м/с}^2$ — ускорение свободного падения; $l = 15,7 \text{ мм}$ — длина линии отрыва (ширина пластины). Снижение поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$) рассчитывали как разницу между значениями поверхностного натяжения стерильной среды (контроль) и пробы исследуемой культуры.

Определение гидрофобности/гидрофильности поверхности клеток проводили по методу Розенберга в модификации Серебряковой [12].

Изучение субстратного спектра штаммов проводили с помощью метода лунок [3] на плотной среде ЭМ. В качестве единственного источника угле-

рода и энергии для микроорганизмов в минеральную среду вносили следующие углеводороды (УВ): н-алканы (изооктан, ундекан, гексадекан), ароматические (бензол, бифенил), полиароматические (нафталин, фенантрен, антрацен), нефтепродукты (дизельное топливо, ТС1, нефть). УВ вносили в лунку диаметром 8 мм, проделанную стерильным пробочным сверлом в центре агаризованной минеральной среды на чашке Петри. Вокруг лунки с субстратом производили штрихом посев культур в направлении от лунки к краю чашки Петри. О способности к ассимиляции УВ судили по интенсивности роста культур спустя 7-14 суток инкубации при 4°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из образца топлива ТС1 на использованных средах получены 5 типов бактериальных колоний. Микроскопический анализ этих бактерий показал, что они имеют морфотип палочек. Окраска колоний — бежевая. Среди выделенных штаммов доминировали грамположительные бактерии.

Молекулярно-генетическая идентификация на основе рибосомальной филогении была проведена для всех выделенных штаммов бактерий. Были определены представители 2 родов: *Rhodococcus* и *Sphingobacterium*. Последовательности депонированы в международную базу данных, им присвоены номера: *Sphingobacterium multivorum* strain Bi2 — MG812313.1, *Rhodococcus jialingiae* strain Bi4 — MG871258.1, *Sphingobacterium mizutaii* strain Bi5 — MG871469.1, *Rhodococcus erythropolis* strain Bi6 — MG871403.1, *Rhodococcus* sp. strain Bi10 — MG871414.1.

В результате определения физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов УОБ показано, что все они являются каталазоположительными, что, согласно литературным данным, может указывать на способность использовать углеводороды Н и НП [2]. Оксидазной активностью обладает *Rhodococcus erythropolis* strain Bi6, остальные — оксидазоотрицательные.

Все штаммы являются факультативными анаэробами, способны в качестве источника углерода и энергии использовать не только углеводы, но и органические кислоты (цитрат натрия). При использовании глюкозы газ не образуют.

Способны для роста использовать как органические, так и неорганические формы азота. Штамм *S. multivorum* не способен к нитратредукции.

Образование индола и сероводорода у выделенных штаммов УОБ не обнаружено. Штаммы *S. mizutaii*, *R. erythropolis* способны декарбоксилировать орнитин.

Известно, что углеводородокисляющая (ферментативная) активность часто сопряжена со способностью микроорганизмов к синтезу поверхностно-активных веществ (ПАВ), повышающих доступность УВ для клеток [8]. Способность к образованию стабильных эмульсий не всегда связана со снижением поверхностного натяжения. Так, биосурфактанты обычно обладают эмульгирующей активностью, в то время как биоэмульгаторы не всегда снижают поверхностное натяжение [20]. В связи с этим, проводили определение способности микробных культур к продукции биоПАВ. Оценку поверхностной активности проводили тремя методами: по определению индекса эмульгирования, измерению показателя поверхностного натяжения и измерению показателя гидрофобности клеток.

В целом, штаммы, относящиеся к роду *Rhodococcus*, характеризуются невысокими показателями эмульгирующей активности. Эмульсии, получен-

ные после осаждения и ресуспендирования в среде ЭМ, биомассы клеток и гексадекана, отличались устойчивостью, их высота не уменьшалась спустя сутки после проведения эксперимента. Так, *R. erythropolis* strain Bi6 показал самую низкую эмульгирующую активность, равную $15,9\% \pm 5,7$. Штаммы *Rhodococcus* sp. strain Bi10 и *R. jialingiae* strain Bi4 имеют показатели эмульгирующей активности $36,9\% \pm 3,2$ и $53,3\% \pm 3,2$ соответственно.

Штаммы УОБ рода *Sphingobacterium* имеют показатели эмульгирующей активности больше 50%: $56,5\% \pm 4,9$ и $50,8\% \pm 5,7$ для *S. multivorum* strain Bi2 и *S. mizutaii* strain Bi5 соответственно. Так как измерение активности проводили в эмульсии с клетками, можно предполагать, что у данных культур, по крайней мере, порядка 50% ПАВ являются экзоПАВ и выделяются в среду культивирования.

Гидрофобность клеток обусловлена липофильностью их клеточной стенки или компонентов клеточной мембраны, некоторые из которых поверхностно-активны. Таким образом, клетки сами по себе могут демонстрировать значительную эмульгирующую активность и выступать в роли биосурфактантных агентов [18]. Регистрация показателя гидрофобности может служить дополнительным критерием отбора бактерий, синтезирующих связанные с клетками биоПАВ, не экскретирующиеся в водную среду [1]. Поэтому для исследования были взяты отмытые от среды и ресуспендированные в среде ЭМ клетки УОБ.

Исследование гидрофобности клеток штаммов УОБ показало, что степень ее в основном не превышала 50%, за исключением *S. mizutaii* Bi5, для которого показатель гидрофобности оказался более 80%. При этом для данного штамма отмечали практически полный переход клеток в гидрофобную фазу, о чем судили по изменению прозрачности суспензии клеток.

Установлено, что снижение поверхностного натяжения среды зависело от штамма УОБ. Штамм *S. multivorum* Bi2 снижал поверхностное натяжение культуральной среды более чем на 21 мН/м, а штаммы *R. jialingiae* Bi4 и *Rhodococcus* sp. Bi10 почти на 15 мН/м. Штамм *R. erythropolis* Bi6 незначительно на 2,5 мН/м повышал значение поверхностного натяжения среды культивирования.

Использованный метод позволяет определять наличие низкомолекулярных ПАВ и можно предположить, что штамм *R. erythropolis* Bi6 может обладать способностью синтезировать высокомолекулярные ПАВ.

Таким образом, суммируя полученные данные можно констатировать, что у штамма *R. erythropolis* Bi6 выявлена самая низкая эмульгирующая активность и отсутствовала способность при росте снижать показатели поверхностного натяжения среды. Остальные штаммы УОБ, выделенные из реактивного топлива ТС-1, снижают поверхностное натяжение жидкости более чем на 10 мН/м. Согласно литературным данным, организмы, снижающие поверхностное натяжение жидкости более чем на 10 мН/м, могут являться перспективными продуцентами ПАВ [18]. Показатель гидрофобности клеток указывает на наличие у выделенных штаммов не экскретирующихся в водную среду эндоПАВ, что особенно выражено у штамма *S. mizutaii* Bi5.

В качестве единственного источника углерода и энергии для микроорганизмов в минеральную среду вносили 11 различных углеводов (см. Материалы и методы). Считается, что при использовании данного метода УВ равномерно диффундируют в агар и частично испаряются, так что культивирование происходит одновременно и на твердом субстрате, и в парах УВ [11]. Полученные результаты представлены в табл.

Изучение роста на плотной среде с добавлением УВ

Углеводородный субстрат	Культура микроорганизма				
	<i>S. multivorum</i> Bi2	<i>S. mizutaii</i> Bi5	<i>R. erythropolis</i> Bi6	<i>Rhodococcus</i> sp. Bi10	<i>R. jialingiae</i> Bi4
Н-алканы					
изооктан	2	2	3	3	4
ундекан	2	2-3	3	3	4
гексадекан	2	2	2	3	4
Ароматические углеводороды (АУ)					
бензол	2-3	2	2	2	2-3
бифенил	2	2-3	2	2-3	2
Полиароматические углеводороды (ПАУ)					
нафталин	1	2	2-3	2-3	3
антрацен	2	2	2	2	2
фенантрен	2	2	2	2	2
Нефтепродукты (НП)					
ДТ	1	4	3	3-4	3
нефть	2	3	3-4	1-2	3
ТС1	1	1	3-4	3	2-3

Примечание. 1 — слабый рост; 2 — умеренный рост; 3 — хороший рост; 4 — отличный рост.

Штаммы рода *Rhodococcus* различаются по типу использования УВ. Штаммы *R. jialingiae* и *R. erythropolis* активно используют для роста н-алканы и НП, а АУ и ПАУ — менее активно, штамм *Rhodococcus* sp. с одинаковой активностью использует все типы УВ.

Представители рода *Sphingobacterium* менее активны в использовании н-алканов, АУ и ПАУ, чем штаммы УОБ рода *Rhodococcus*. *S. multivorum* слабо использует для роста Н и НП, а штамм *S. mizutaii* показывает активный рост на Н и дизельном топливе. По сравнению с другими штаммами эти культуры используют ТС1 с наименьшей активностью.

Участие микроорганизмов в деструкции органического вещества осуществляется ассоциациями в процессе реализации принципа кооперативного существования [5], когда продукты жизнедеятельности предыдущего вида служат питательной средой для жизнедеятельности последующего. Микробное окисление углеводов Н и НП происходит через серию каталитических процессов с образованием промежуточных продуктов метаболизма — спиртов, альдегидов, кетонов, жирных и карбоновых кислот, которые, в конечном итоге, окисляются до углекислого газа. Из реактивного топлива ТС-1 выделены штаммы УОБ, различающиеся по способности использовать для роста углеводороды, синтезирующие как экзогенные, так и эндогенные ПАВ. Полученные штаммы УОБ, объединенные в консорциум, могут служить основой для создания биопрепаратов для биоремедиации вод и почв при аварийных разливах Н и НП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках выполнения государственного задания 4.6718.2017/6.7 (анкета 1422), государственного задания 10.5422.2017/8.9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волченко Н.Н., Карасёва Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий — продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешлама. *Биотехнология*. 2006, 2: 45-60.
2. Гоголева О. А., Немцева Н. В., Бухарин О. В. Каталазная активность углеводородокисляющих бактерий. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2012, 48(6): 612-618.
3. Егоров Н. С. (ред.). *Практикум по микробиологии*. Учеб. пособие. МГУ, 1976.
4. Егорова М. А., Нетрусов А. И. *Практикум по микробиологии*. Учеб. пособие для студ. ВУЗов., М., Изд. центр «Академия», 2005.
5. Заварзин Г. А., Колотилова Н. Н. *Введение в природоведческую микробиологию*. М., Университет, 2001.
6. Квасников Е. И., Ключникова Т. М. *Микроорганизмы-деструкторы нефти в водных бассейнах*. Киев, Наукова думка. 1981.
7. Лысак Л. В., Скворцова И. Н., Добровольская Т. Г. *Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий*. МАКС пресс, 2003.
8. Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Григорьян А.А., Сюэ Я.-Ф., Беляев С.С., Иванов М.В. Образование нефтewытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин. *Микробиология*. 2003, 72(2): 206-211.
9. Нечаева И. А. и др. Стимуляция микробной деструкции нефти в почве путем внесения бактериальной ассоциации и минерального удобрения в лабораторных и полевых условиях. *Биотехнология*. 2009, 1:64-70.
10. *Определитель бактерий Берджи*. 1997, 1:94-155.
11. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии*. Практ. пособие (под ред. Н.С. Егорова). М., Изд-во Моск. ун-та, 1983.
12. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа. *Микробиология*. 2002, 71(2):237-239.
13. Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами. *Нефтегазовая геология. Теория и практика*. 2012, 7(1):15-43.
14. Шукин Е.Д., Перцов А.В., Амелина Е.А. *Коллоидная химия*. М., Высшая школа, 2004.
15. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009, 10:421.
16. Cooper D.G., Goldenberg G.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53(2):224-229.
17. Evans C.G.T., Herbert D., Tempest D.W. The continuous cultivation of microorganisms: construction of a chemostat. *Methods Microbiol.* 1970, 2(277):e327.
18. Francy D.S., Thomas J.M., Raymond R.L., Ward. C.H. Emulsification of hydrocarbon by subsurface bacteria. *J. Industrial Microbiology*. 1991, 8:237-246.
19. Head I. M., Jones D. M., Ruling W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*. 2006, 4(3):173.
20. Karanth N.G.K., Deo P.G., Veenanadig N.K. Microbial production of biosurfactant and their importance. *Ferment. Sci. Technol.* 1999, 77:116-126.
21. Lane D. J. et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, 82(20):6955-6959.
22. Muyzer G., Stams A.J.M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2008, 6(6):441.
23. Rosenberg E. Biosurfactants. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. (Ed. Dworkin M. et al.). New York, Springer Science, Business Media Inc., 2006.

К.А.Собянин., Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

РОЛЬ ПРИРОДНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРОВ ИНВАЗИИ *LISTERIA MONOCYTOGENES* В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ЛИСТЕРИОЗЕ

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва

Цель. Определить вклад природных вариантов фактора инвазии *Listeria monocytogenes* InlB в вероятность развития перинатальной инфекции на модели интрагастрального заражения беременных мышей. *Материалы и методы.* Мышам на 12-16 день беременности интрагастрально вводили 10^8 КОЕ изогенных рекомбинантных штаммов *L. monocytogenes* EGDe Δ inlB::InlB9 и EGDe Δ inlB::InlB14, экспрессирующих отличающиеся природные варианты InlB9 и InlB14. Через 72 час мышей подвергали эвтаназии, вскрывали и оценивали микробную нагрузку во внутренних органах. *Результаты.* Перинатальная инфекция наблюдалась только при инфекции штаммом, экспрессирующим InlB14. Также микробная нагрузка этого штамма превышала нагрузку штамма EGDe Δ inlB::InlB9 в 715, 315 и 70 раз для печени, селезенки и Пейеровых бляшек соответственно ($p < 0,01$). Микробные нагрузки в эпителии тонкого кишечника были сравнимы для двух штаммов. Раздельные высевы плацент и плодов одной мыши, инфицированной EGDe Δ inlB::InlB14, выявили возбудитель в 5 плацентах и 2 плодах из 9. *Заключение.* Природные варианты InlB отличаются по своей способности способствовать развитию перинатальной инфекции при интрагастральном пути введения *L. monocytogenes*.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 114—118

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, природные факторы инвазии, листериоз

К.А.Собянин, Е.В.Сысолятина, Я.М.Чаленко, А.Я.Лаврикова, Е.В.Калинин, В.И.Пушкарева, С.А.Ермолаева

THE ROLE FOR NATURALLY OCCURRING VARIANTS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* INVASION FACTORS IN PERINATAL LISTERIOSIS

Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow Russia

Aim. Using the model of intragastric *Listeria monocytogenes* infection in pregnant mice to compare an input of found in nature variants of the invasion factor InlB in perinatal listeriosis. *Materials and methods.* Mice on 12-16 days of pregnancy were injected intragastrically with 10^8 CFU of isogenic recombinant *L. monocytogenes* strains EGDe Δ inlB::InlB9 and EGDe Δ inlB::InlB14. The strains expressed naturally occurring InlB variants, InlB9 and InlB14. In 72 h, mice were subjected to euthanasia to evaluate bacterial loads in the internal organs. *Results.* Only the strain, which expressed InlB14, caused perinatal infection. Microbial loads in the liver, spleen and Peyer's patches was 715, 315 and 70 times higher for this strain than for the strain EGDe Δ inlB::InlB9 ($p < 0,01$). Microbial loads in the villous epithelium were comparable for both strains. Separate plating of placentas and fetuses infected with EGDe Δ inlB::InlB14 demonstrated that 5 and 2 placentas and fetuses, respectively, were infected from totally 9 embryonic structures. *Conclusion.* Naturally occurring InlB variants differed in their ability to provide perinatal listeriosis in intragastrically infected mice.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.4, P. 114—118

Key words: *Listeria monocytogenes*, naturally variants invasion factors, listeriosis

ВВЕДЕНИЕ

Грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* относится к числу хотя и не самых распространенных, однако опасных возбудителей пищевых инфекций. В целом по миру общее число случаев листериозной инфекции в последнее десятилетие не превышало 0,2-0,8 на 100 000 населения [8]. Вместе с тем, подавляющее число зарегистрированных больных с диагнозом «листериоз» госпитализируют, а летальность достигает 25-35 % от числа заболевших [6, 9]. Особенно тяжелые последствия имеет перинатальный листериоз. Частота развития перинатального листериоза составляет от 2 до 25 случаев на 100 000 новорожденных, при этом летальность достигает 30-35 % [11, 12]. В Российской Федерации в ходе только одной вспышки инфекции было зафиксировано 13 случаев перинатального листериоза с летальным исходом [3].

Проведенные в 2005-2015 гг. эпидемиологические исследования позволили нам выдвинуть гипотезу о том, что штаммы, ассоциированные с перинатальным листериозом, характеризуются определенным вариантом фактора инвазии InlA, одного из двух основных факторов инвазии *L. monocytogenes* [1, 4]. Эпидемиологические данные однако недостаточны для того, чтобы сделать вывод, имеет ли выявленный признак только диагностический характер или отражает вклад природных вариантов факторов инвазии в увеличении вероятности развития перинатального листериоза.

Для установления роли природных вариантов факторов инвазии в перинатальном листериозе мы решили разработать экспериментальную модель перинатальной инфекции на лабораторных мышах. Из двух основных факторов инвазии, относящихся к семейству интерналинов, InlA и InlB, роль в инвазивной инфекции мышевидных грызунов играет только InlB [13]. Эпизотологические данные свидетельствуют о существовании корреляции между инвазивной листериозной инфекцией и вариантом InlB, выявляемого у возбудителя, циркулирующего среди мелких мышевидных грызунов в природных очагах [1, 2, 7, 15]. Моделируя перинатальный листериоз у лабораторных мышей, мы сравнили два природных варианта InlB, один из которых был характерен для штаммов, изолированных от грызунов в природных очагах, а второй не встречался среди изолятов от грызунов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали ранее сконструированные изогенные рекомбинантные штаммы *L. monocytogenes*: EGDe Δ inlB::InlB9 и EGDe Δ inlB::InlB14 [14]. Штаммы сконструированы на основе штамма EGDe Δ inlB с делецией хромосомной копии гена *inlB* и несут многокопийную плазмиду, экспрессирующую один из вариантов InlB: вариант InlB9 характерен для штаммов высоковирулентного эпидемического клона ЕС1 и не встречался среди изолятов от грызунов [7], вариант InlB14 характерен для изолятов, выделенных от грызунов, и также был найден у изолятов при вспышках листериоза среди людей [2, 7]. Варианты отличали 9 аминокислотных замен [14].

Использовали беспородных мышей весом 30-35 г. Для воспроизводимой модели перинатального листериоза самкам подкожно был введен 17-эстрдиол-бета (0,3 мкг/г). Через 2 суток к самкам был подсажен самец. Опыт начинали через 15 дней после подсадки самца. Самки с детектируемой беременностью были произвольно разделены на группы по 3 головы. Перед инфекцией животных выдерживали 12 часов без еды. Инфекция осуществлялась интрагастрально в объеме 100 мкл с использованием изогнутой

иглы диаметром 0.6 mm и длиной 25 mm с затупленным краем. Культуры *L. monocytogenes* для инфекции готовили заранее: экспоненциальную культуру отмывали и замораживали в 10 % глицерине при -70°C . Непосредственно перед опытом культуру размораживали и разводили до необходимой концентрации в PBS. В указанные сроки животных усыпляли эфиром, вскрывали, органы стерильно изымали и гомогенизировали в PBS с использованием гомогенизатора ИКА-Т10. Обсемененность органов определяли высевами десятикратных разведений гомогенатов на агар Brain Heart Infusion (BHI, BD), содержащий эритромицин (10 мкг/мл). Все высевы проводили в дубликate. Вычисление средних значений, среднеквадратичного отклонения и статистической значимости (критерий Стьюдента) проводили в программе Excel.

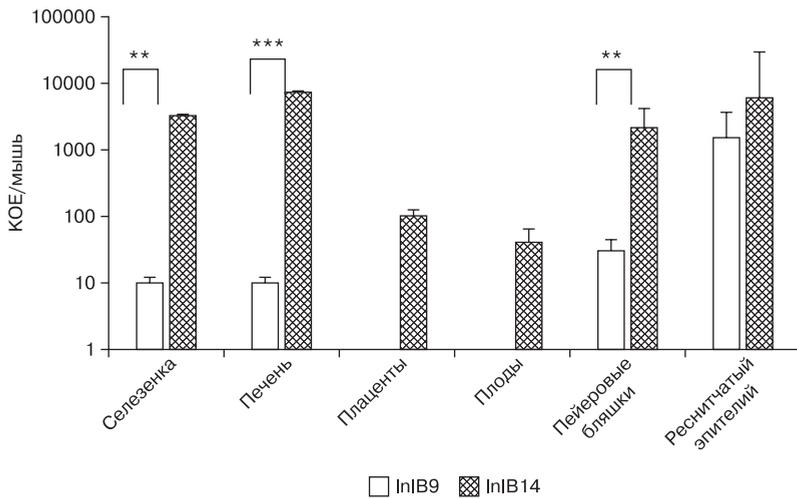
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных экспериментах определили оптимальную дозу заражения. Доза LD50 при интрагастральном пути введения штамма дикого типа EGDe превышала 10^9 КОЕ/мышь [5]. Для определения дозы, позволяющей достоверно выявлять инвазивную инфекцию, небеременным самкам вводили интрагастрально бактерии штамма дикого типа EGDe и его производного EGDe Δ inlB в количестве 10^6 или 10^8 КОЕ/мышь и исследовали присутствие возбудителя в печени и селезенке через 24 часа. При низкой дозе возбудителя бактерии, лишенные гена inlB, во внутренних органах не выявлялись, а бактерии дикого типа выявлялись в единичных колониях. При более высокой дозе возбудитель уверенно выделялся в печени и селезенке животных. В дальнейших экспериментах использовали дозу 10^8 КОЕ/мышь.

В эксперименте использовали изогенные штаммы EGDe Δ inlB::InlB9 и EGDe Δ inlB::InlB14, несущие рекомбинантные плазмиды, которые экспрессировали белки InlB: InlB9 и InlB14 соответственно [14]. Определили накопление бактерий штаммов EGDe Δ inlB::InlB9 и EGDe Δ inlB::InlB14 во внутренних органах беременных мышей через 72 часа после инфекции. Штамм дикого типа в сравнение не включили, так как уровень продукции InlB в рекомбинантных штаммах был значительно выше за счет копийности плазмид [14].

Оба штамма выявлялись как в тканях кишечника, так и в печени и селезенке (рис.). Количество бактерий, инфицирующих эпителий кишечника, было приблизительно одинаковым для исследуемых штаммов ($p > 0,05$). Однако в других тканях нагрузки существенно различались. Особенно большие различия наблюдались в печени — количество бактерий штамма EGDe Δ inlB::InlB14 превышало количество бактерий штамма EGDe Δ inlB::InlB9 в 715 раз ($p < 0,001$). Различия в селезенке и Пейеровых бляшках составляли 315 и 70 раз соответственно ($p < 0,01$). Только бактерии штамма EGDe Δ inlB::InlB14 выявлялись в плаценте и плодах.

Интересно, что распределение бактерий штамма EGDe Δ inlB::InlB14 среди отдельных плодов одной и той же самки значительно различалось. Из 9 плодов и плацент, исследованных по отдельности, возбудитель был обнаружен в 5 плацентах, и только 2 плода, ассоциированные с инфицированными плацентами, были инфицированы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что природные варианты InlB отличаются по своей способности к развитию перинатальной инфекции при интрагастральном пути введения возбудителя; вероятность развития перинатальной инфекции коррелирует с бактериальными нагрузками в печени, селезенке и Пейеровых бляшках, но не эпителии кишечника, а также, что инфицирование отдельных плацент происходит независимо друг от друга.



Микробные нагрузки во внутренних органах беременных мышей через 72 часа после интрагастрального введения 10^8 КОЕ штаммов EGDe Δ inlB::InlB9 (InlB9) и EGDe Δ inlB::InlB14 (InlB14).

Показаны средние значения \pm стандартное отклонение. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$. В эмбриональных органах (плоды и плаценты) бактерий штамма EGDe Δ inlB::InlB9 выявлено не было.

Целью работы было выяснение потенциала влияния природных вариантов фактора инвазии InlB на развитие перинатального листериоза. Для того, чтобы устранить эффект вариабельности других бактериальных факторов патогенности, в работу были включены изогенные штаммы *L. monocytogenes*, различающиеся только по последовательности InlB. Исползованные штаммы были сконструированы ранее и экспрессировали широко распространенные варианты InlB, обозначенные InlB9 и InlB14 [14]. Оба варианта, InlB9 и InlB14, выявляются среди клинических изолятов *L. monocytogenes* и широкого круга штаммов, выделенных от других источников [2, 3, 7, 15]. Важным эпидемиологическим отличием вариантов, непосредственно касающихся мышшиной модели листериоза, было то, что InlB14 характерен для изолятов, выделенных от диких мышевидных грызунов в природных очагах листериоза, в то время как InlB9 не был выявлен у изолятов, полученных от грызунов [2, 7, 15].

Сравнение бактериальных нагрузок во внутренних органах животных, инфицированных разными штаммами, показало существование корреляции между развитием перинатальной инфекции и количеством бактерий в печени, селезенке и Пейеровых бляшках. Полученные результаты показывают, что вариант InlB14 обеспечивает более высокий уровень инфекции внутренних органов мыши, что, с одной стороны, может служить причиной более высокой вероятности развития перинатального листериоза, а с другой — объясняет, почему в природных очагах листериоза, включающих популяции диких мышевидных грызунов, преимущественно выделяются штаммы *L. monocytogenes*, несущие именно этот вариант InlB.

Интересно, что бактериальные нагрузки в эпителии тонкого кишечника были сопоставимы для обоих штаммов. Эти данные коррелируют с выводами Chiba S. et al. [8], что InlB играет важную роль в инвазии Пейеровых бляшек, откуда *L. monocytogenes* может распространяться в энтероциты путем межклеточного перемещения, используя другой фактор патогенности — белок ActA.

Ранее ключевая роль факторов инвазии InlA и InlB в развитии перинатальной инфекции была показана на ряде моделей *in vitro* и *in vivo* [10]. Наши результаты впервые показывают, что различные природные варианты факторов инвазии обеспечивают разный уровень обсемененности эмбриональных органов и, таким образом, могут определять вероятность развития перинатального листериоза. Сравнивая полученные экспериментальные данные с результатами ранее проведенных эпидемиологических исследований, установивших консерватизм фактора инвазии InlA у филогенетически удаленных штаммов *L. monocytogenes*, выделенных от мертворожденных [3, 12, 15], можно предположить, что выявленный в процитированных работах вариант InlA является не только маркером потенциально опасных штаммов, но и может играть прямую роль в развитии перинатального листериоза у человека.

Работа была поддержана грантом РФФИ №17-04-00169.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адгамов Р.Р., Тимченко Н.Ф., Зайцев Е.А., Пушкарева В.И., Колбасов Д.В., Егорова И.Ю., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Ермолаева С.А. Эколого-генетические механизмы формирования эпидемически значимых вариантов возбудителей сапронозных инфекций. *Успехи современной биологии*. 2012, 132(6):551-567.
2. Зайцева Е.А., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Гены, кодирующие факторы инвазии у штаммов *Listeria monocytogenes*, изолированных в Европейской части и Дальневосточном регионе России. *Журн. микробиол.* 2006, (4):42-45.
3. Зайцева Е.А., Пуховская Н.М., Мусатов Ю.С., Иванов Л.И., Ермолаева С.А., Сомов Г.П. Молекулярно-генетические особенности и эпидемиологическая значимость штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных от беременных женщин и из абортного материала в Дальневосточном регионе России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007, 9:81-89.
4. Ермолаева С.А., Зайцева Е.А., Тимченко Н.Ф., Адгамов Р.Р. Вариабельность функциональных доменов факторов патогенности как молекулярная основа полигостальности возбудителей сапронозов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010, (4):24-28.
5. Собянин К.А. Влияние природных вариантов факторов инвазии на проникновение *Listeria monocytogenes* в эукариотические клетки. Дис. канд.биол. наук. М., 2016.
6. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. *Медицина для всех*. М., 2002.
7. Adgamon R., Zaytseva E., Thiberge J-M. et al. Genetically related *Listeria monocytogenes* strains isolated from lethal human cases and wild animals. *In: Genetic Diversity of Microorganisms*. Caliskan M. (Ed). 2012.
8. Chiba S., Nagai T., Hayashi T. et al. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches *in vivo*. *Microbiol Immunol*. 2011, 55(2):123-129.
9. de Noordhout C., Devleeschauwer B., Angulo F.J. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*. 2014, 14(11): 1073-1082.
10. Disson O., Grayo S., Huillet E. et al. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*. 2008, 455(7216):1114-1118.
11. Elinav H., Hershko-Klement A., Valinsky L. et al. Pregnancy-associated listeriosis: clinical characteristics and geospatial analysis of a 10-year period in Israel. *Clin. Infect. Dis.* 2014, 59(7):953-961.
12. Girard D., Leclercq A., Laurent E. et al. Pregnancy-related listeriosis in France, 1984 to 2011, with a focus on 606 cases from 1999 to 2011. *Euro Surveill*. 2014, 19(38):20909.
13. Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C. et al. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*. 1999, 18(14):3956-3963.
14. Sobyanin K., Sysolyatina E., Krivozubov M. et al. Naturally occurring InlB variants that support intragastric *Listeria monocytogenes* infection in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 2017, 364(3):fnx011.
15. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Kunda M.S. et al. Diversity and Pathogenic Potential of *Listeria monocytogenes* Isolated from Environmental Sources in the Russian Federation. *Int. J. Mod. Eng. Res.* 2015, 5:5-13.

*И.С.Тартаковский¹, О.А.Груздева², Т.И.Карпова¹, Ю.Е.Дронина¹, Т.А.Тарасова¹,
О.Г.Логинова¹, М.Н.Дмитриева¹*

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ЭЛИМИНАЦИЮ ПЛАНКТОННЫХ КЛЕТОК И БИОПЛЕНОК ЛЕГИОНЕЛЛ В ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ВОДНЫХ СИСТЕМАХ

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва, ²Первый московский государственный медицинский университет им.И.М.Сеченова

Цель. Сравнительное изучение различных методических подходов, направленных на элиминацию легионелл в потенциально опасных водных системах. *Материалы и методы.* Оценку эффективности краткосрочного повышения температуры воды до 70°C проводили в модуле водоснабжения с регулируемым температурным режимом объемом 290 литров. Оценку эффективности метода каталитической очистки воды проводили в бассейне для водоплавающей птицы объемом 10 000 литров. Исходный, промежуточный и конечный уровень колонизации водных систем *Legionella pneumophila* проводили в соответствии с методикой, описанной в МУК 4.2.2217-07. Наличие биопленок, содержащих легионеллы, на поверхности оборудования и границе водной среды или в шаровых краях системы водоснабжения определяли визуально с последующим бактериологическим подтверждением присутствия легионелл в биопленках. *Результаты* Показана высокая бактерицидная активность применявшихся методов в отношении планктонных форм и биопленок легионелл в водных системах различного типа. Полученные результаты свидетельствуют, что тепловой шок (70°C в течение 24 часов) в условиях работающего модуля системы горячего водоснабжения обладает краткосрочным эффектом, не превышающим 2 месяцев эксплуатации. Бактерицидный эффект каталитической очистки воды при достаточно высоком исходном уровне контаминации водного объекта проявлялся не ранее 3 недель экспозиции и сохранялся в течение 2 месяцев эксплуатации каталитического модуля. *Заключение.* Представленные в работе методические подходы могут быть использованы для разработки эффективной и рациональной стратегии обеспечения профилактики легионеллеза при эксплуатации различных водных систем и объектов в общественных зданиях.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 119—124

Ключевые слова: *L.pneumophila*, водные объекты, биопленки, профилактика

*I.S.Tartakovsky¹, O.A.Gruzdeva², T.I.Karpova¹, Yu.E.Dronina¹, T.A.Tarasova¹, O.G.Loginova¹,
M.N.Dmitrieva¹*

ANALYSIS OF THE DIFFERENT METHODOLOGICAL APPROACHES DIRECTED ON THE ELIMINATION OF PLANKTON FORMS AND *LEGIONELLA* BIOFILMS FROM POTENTIALLY DANGEROUS WATER SYSTEMS

¹Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Comparative study of the different methodical approaches directed on the elimination of plankton forms and *Legionella* biofilms from potentially dangerous water systems. *Materials and methods.* Evaluation of short-term heating of water to 70°C implemented in water supply module by volume 290 L with regulated temperature profile. Evaluation of catalytic cleansing of water implemented in the pool for water birds by volume 10 000 L. The initial, intermediate and final level of water objects colonization by *L. pneumophila* determined accordance MUK 4.2.2217-07. Presence of biofilms associated with *L. pneumophila* on the surface of the equipment, water surface and ball valves of water supply system determined visual with subsequent bacteriological confirmation by

L. pneumophila isolation from biofilms. *Results.* The high level of bactericidal activity against *L. pneumophila* plankton forms and biofilms was shown by both methods. Short-term heating to 70° during 24 hours prevented *Legionella* growth for 2 months of management. The catalytic cleansing of water against high initial level of contamination of water object by *L. pneumophila* manifested not earlier 3 weeks of maintenance and continued during 2 months. *Conclusion.* The presented methodical approaches can be used for development of efficient strategy of prevention of legionellosis during management of the different potentially dangerous water systems in public buildings.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 119—124

Key words: *L. pneumophila*, water objects, biofilms, prevention

ВВЕДЕНИЕ

В конце XX века стали известны основные аспекты экологии легионелл и типы потенциально опасных водных систем, в которых легионеллы могут размножаться до эпидемически значимых концентраций. Не менее важным стало и понимание того обстоятельства, что сам факт обнаружения легионелл в природных и искусственных водных системах не свидетельствует о непосредственной угрозе болезни легионеров. Известно, что в природных водоемах концентрация легионелл обычно не превышает 10^3 КОЕ на литр, в то время как в потенциально опасных водных системах (системы горячего водоснабжения, джакузи, бассейны, градирни) концентрация может вырасти до 10^6 - 10^7 КОЕ на литр, что может привести к возникновению эпидемических вспышек и спорадических случаев легионеллезной инфекции [8,15].

Поэтому профилактика легионеллеза в настоящее время направлена на элиминацию или существенное снижение концентрации легионелл в потенциально опасных водных системах. С этой целью за последние годы был апробирован широкий спектр химических агентов (биоцидов) и физических факторов [1, 9]. Несмотря на разнообразие предлагаемых методических подходов, оценка их эффективности весьма затруднительна. Речь идет о дезинфекции больших объемов воды, в которых необходимо добиться положительного эффекта не только в отношении планктонных форм легионелл, но и природных биопленок, содержащих легионеллы. Известно, что природные биопленки являются основными «накопителями» легионелл в водных системах и в их составе отличаются значительно более высоким уровнем устойчивости к дезинфектантам [13, 16]. Данные, полученные в отношении легионелл в лабораторных модельных системах с использованием моновидовых биопленок, недостаточно информативны для экстраполяции их на реальные потенциально опасные водные объекты [3,10]. В данной работе использовали два различных методических подхода — тепловой шок в условиях модуля водоснабжения с регулируемым температурным режимом и установку для каталитической обработки воды в искусственном бассейне для водоплавающих птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки эффективности теплового шока использовали установку, позволяющую моделировать различные температурные и гидравлические режимы, используемые при осуществлении горячего водоснабжения в многоквартирных домах объемом 290 литров. Установка представляет собой замкнутый контур с постоянной циркуляцией теплой воды (50°С), которая обеспечивается отдельным циркуляционным насосом, управляемым цифровым контролером. Для получения объективной картины в состав установки

входили элементы из различных материалов, применяемых в системах горячего водоснабжения (стальные трубы оцинкованные, металлопластик, латунь, резиновые шланги). Оценку эффективности метода каталитической очистки воды с использованием установки УКОВ серии ИТ-1-О-20-ГАУМЗ (АО «Ионообменные технологии») проводили в бассейне для водоплавающей птицы объемом 10 000 литров. В качестве активатора каталитической реакции использовали светодиодную лампу малой мощности (10 Вт) для облучения каталитического модуля установки.

Исходный, промежуточный и конечный уровень колонизации водных систем *Legionella pneumophila* и ОМЧ проводили в соответствии с методикой, описанной ранее в МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды» [9]. Наличие биопленок, содержащих легионеллы, на поверхности оборудования и границе водной среды или в шаровых кранах системы водоснабжения определяли визуально с последующим бактериологическим подтверждением присутствия легионелл в биопленках [4,5].

РЕУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки эффективности теплового воздействия осуществляли кратковременное (на 24 часа) повышение температуры воды, циркулирующей в замкнутом контуре до 70°C, после чего температура воды в контуре снова была выведена на уровень 50°C. Уровень колонизации *L. pneumophila* и общее микробное число (ОМЧ) определяли в трех зонах водного контура с различной интенсивностью скорости водного потока (табл.1). Полученные данные свидетельствовали о существенном исходном уровне колонизации легионеллами с превышением допустимого уровня (10³КОЕ на литр) и образованием биопленок в зоне застоя. После профилактического прогревания воды в системе до 70°C в течение суток температура воды в системе снова была выведена на уровень 50°C. Полученные результаты свидетельствуют, что профилактическое прогревание воды системы горячего водоснабжения закрытого типа до 70°C в течение суток обладает выраженным бактерицид-

Таблица 1. Влияние теплового шока на уровень колонизации *Legionella pneumophila* контура системы горячего водоснабжения

Показатели колонизации системы	Точка отбора пробы	Общее микробное число (ОМЧ) в мл	Планктонные формы <i>L. pneumophila</i> в литре	Выделение <i>L. pneumophila</i> из биопленок
Исходные значения при 50°C	б	42	74	—
	зц	54	2,2 x 10 ²	—
	зз	6,5 x 10 ²	1,2 x 10 ⁴	+
Сразу после теплового шока (70°C в течение 24 ч)	б	—	—	—
	зц	—	—	—
	зз	—	—	—
Результат анализа отбора через 10 дней после теплового шока	б	—	—	—
	зц	—	—	—
	зз	—	—	—
Результат анализа отбора через 30 дней после теплового шока	б	—	—	—
	зц	—	—	—
	зз	—	8	—
Результат анализа отбора через 60 дней после теплового шока	б	—	—	—
	зц	24	58	—
	зз	28	1,6 x 10 ²	+

Примечание. + Выделение *L. pneumophila* из биопленки, — отсутствие роста биопленок и планктонных форм микроорганизмов (здесь и в табл. 2); б — бойлер, зц — зона циркуляции, зз — зона застоя.

ным действием на легионеллы и другие санитарно-показательные микроорганизмы. В то же время, полученные результаты подтверждают представление об отсутствии полной элиминации легионелл из системы при наличии биопленок. В застойных участках системы планктонные формы легионелл можно было обнаружить спустя месяц после прогревания, а через 2 месяца снова наблюдали существенный уровень колонизации водного контура.

В основе действия другого методического подхода, использованного в данном исследовании, лежит каталитическая очистка водной системы. Принцип технологии основан на действии биологических поверхностно-активных веществ естественного происхождения (биотензидов), продуцируемых каталитическим модулем из специального металлического сплава (Cr-Ni-Fe) при облучении поверхности модуля светодиодной лампой малой мощности [6]. Бактерицидный эффект метода при достаточно высоком исходном уровне контаминации водного объекта проявлялся не ранее 3 недель экспозиции и сохранялся в течение 2 месяцев эксплуатации каталитического модуля (табл. 2). Некоторое возрастание концентрации планктонных форм легионелл через 2 недели экспозиции может быть связано с постепенным разрушением биопленок, сопровождаемым выходом жизнеспособных клеток легионелл в водную среду. Последующий анализ образцов воды и остаточных биопленок свидетельствовал о полной элиминации легионелл из бассейна.

В настоящее время требования по применению различных методов профилактики легионеллеза в Российской Федерации, направленных на элиминацию планктонных клеток и биопленок легионелл из потенциально опасных водных системам, носят весьма обобщенный характер и не конкретизированы для различных водных объектов [1,7,9]. Ситуация кардинальным образом отличается в худшую сторону по сравнению с методами количественного мониторинга легионелл в водных объектах и методами лабораторной диагностики легионеллеза, в полной мере соответствующими современным международным стандартам [14,15].

Дезинфекция потенциально опасных водных систем и снижение в них концентрации легионелл до безопасного для человека уровня является в настоящее время единственным реальным путем профилактики легионеллеза. Выбор метода дезинфекции основывается на анализе чувствительности легионелл к различным химическим и физическим факторам и знании особенностей экологии возбудителя в разных типах потенциально опасных водных систем.

Так, анализ частоты применения различных профилактических подходов за рубежом показал, что для профилактики легионеллеза в системе горячего водоснабжения тепловой шок (то есть кратковременное нагревание воды до температуры 70-75°C) использовали в 60% случаев проведения профилактических мероприятий, биоциды (как правило, хлорсодержащие соединения) — в 45% случаев, ионизацию серебром и медью — в 8%, озонирование — в 2% случаев (в ряде случаев возможно одновременное применение нескольких методов).

Таблица 2. Влияние каталитической очистки (КО) воды на уровень колонизации *L. pneumophila* бассейна для водоплавающих птиц

Показатели	Исходная концентрация микроорганизмов до начала КО	через 14 дней	через 21 день	через 30 дней	через 60 дней
ОМЧ в мл воды	5×10^3	9×10^2	3×10^2	-	-
Планктонные формы <i>L.pneumophila</i> в л воды	$6,5 \times 10^2$	5×10^3	-	-	-
Выделение <i>L.pneumophila</i> из биопленок	+	+	+	-	-

Полученные результаты свидетельствуют, что воздействие достаточно высокой температуры (70°C), полностью элиминирующей планктонные формы и моновидовые биопленки легионелл в лабораторных условиях [10], в условиях работающего модуля системы горячего водоснабжения обладает краткосрочным эффектом. Вместе с тем, краткосрочное ежеквартальное прогревание воды, циркулирующей в системе горячего водоснабжения до 70°C, может найти достаточно широкое применение для профилактики легионеллеза при эксплуатации систем горячего водоснабжения.

Весьма актуален и поиск новых технологий, обеспечивающих эффективную, простую и безопасную для населения элиминацию легионелл из водных объектов. Каталитическая очистка, использованная в данном исследовании, может стать одной из таких технологий. Методы, основанные на применении химических соединений (гипохлорит натрия, монохлорамин, двуокись хлора), широко используемые за рубежом для обеззараживания водных объектов, часто являются мощными окислителями с соответствующим риском как для эксплуатируемого оборудования, так и для физических лиц непосредственно с ним контактирующих [11,12,15]. Используемый в работе каталитический модуль в сочетании со светодиодной лампой малой мощности достаточно безопасен в эксплуатации и эффективен в элиминации планктонных форм и биопленок легионелл.

Исследования последних лет свидетельствуют о достаточно высоком уровне колонизации легионеллами потенциально опасных водных систем в зданиях общественного назначения (гостиницы, больницы, офисные и торговые центры) в условиях мегаполиса [1,2,9]. Представленные в данной работе методические подходы могут быть использованы для разработки эффективной и рациональной стратегии обеспечения профилактики легионеллеза при эксплуатации различных водных систем и объектов в общественных зданиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Груздева О.А. Научно-методические основы профилактики легионеллеза в гостиничных комплексах. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 2:49-53.
2. Груздева О.А. Научно-методические основы обеспечения профилактики легионеллеза в условиях мегаполиса. Автореф. дисс. д-ра мед. наук. М., 2017
3. Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Алексеева Н.В. и др. Формирование биопленок *Legionella* spp. в эксперименте. Журн.микробиол. 2008, 1:3-7.
4. МУК 4.2.2217- 07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды», 2007.
5. Садретдинова О.В., Груздева О.А., Карпова Т.И. и др. Контаминация *Legionella pneumophila* систем горячего водоснабжения зданий общественного назначения, в том числе лечебно-профилактических учреждений. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011, 2:163-167.
6. Самсонова С.П., Сергиенко А.И., Шалимова Е.В. и др. Очистка воды от микробиологических загрязнений и биопленок в оборотных системах различного назначения. Водоснабжение и санитарная техника. 2017, 6:22-27
7. Санитарные Правила 3.1.2.2626-10 «Профилактика легионеллеза», 2010.
8. Тартаковский И.С., Демина Ю.В. Методология и стандарты профилактики легионеллеза. Жизнь без опасности. 2010, 4:108-120.
9. Тартаковский И.С., Груздева О.А., Галстян Г.М., Карпова Т.И. Профилактика, диагностика и лечение легионеллеза. М., 2013.
10. Тартаковский И.С., Карпова Т.И., Груздева О.А. и др. Влияние температуры на жизнеспособность планктонных клеток и модельных биопленок *Legionella pneumophila* в воде. Журн. микробиол. 2015, 5: 7-11.
11. Barbaree J.M., Gorman G., Martin W.T. et. al. Protocol for sampling environmental sites for legionellae. Appl. and Environ. Microbiol. 1987, 53(7):1454-1458.
12. Cooper A., Barnes H.R., Myers E.R. Assessing risk of *Legionella*. Ashrae J. 2004, 46(4): 22-26.

13. Declerck I.P. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* 2010, 12(3):557-566.
14. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E. Legionella and Legionnaires Disease: 25 years of investigation. *Clin. Microb. Rev.* 2002, 15(3):506-526.
15. Legionella and prevention of Legionellosis. Ed. J.Bartram. WHO, 2007.
16. Mampel J., Sprig T., Weber S.S. Planctonic replication is essential for biofilm formation by *Legionella pneumophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72(4):2885-2895.

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ. АТЛАС-РУКОВОДСТВО (Под ред. Быкова А.С., Зверева В.В.). М., Медицинское информационное агентство, 2018, 416 с.

Издание атласа подготовлено коллективами кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии и кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Оно рекомендовано Координационным советом по области образования «Здравоохранение и медицинские науки» в качестве учебного пособия для использования в образовательных учреждениях, реализующих основные профессиональные образовательные программы высшего образования по программам специалитета области образования «Здравоохранение и медицинские науки».

Материал атласа изложен в соответствии с официально утвержденными федеральными государственными стандартами преподавания микробиологии и иммунологии для студентов высшего профессионального образования, о чем свидетельствует также список экзаменационных вопросов со ссылкой на соответствующие страницы издания, где освещена данная тематика. Атлас выполнен в виде гипертекста с электронограммами микробов, цветными микрофотографиями, рисунками, схемами и таблицами. В нем представлен ряд совершенно новых разделов, которые еще широко не вошли в учебно-методическую литературу, но имеют существенное значение в образовании врачей. Это касается таксономии микроорганизмов, а также роли факторов врожденного и адаптивного иммунитета и факторов вирулентности микробов при различных патологиях.

Атлас состоит из 7 глав: 1). Мир микробов; 2). Микробиологическая диагностика; 3). Бактериология; 4). Вирусология; 5). Протозология; 6). Микология; 7). Иммунология и аллергология. Поиск информации облегчается подробным предметным указателем и указателем микроорганизмов.

В атласе приведены общепризнанные за последние годы данные в максимально объективной, сжатой и доступной форме. Представлены новые сведения: таксономия и классификация микробов, девять типов секреторных систем бактерий. В едином ключе приведены данные по механизмам и путям передачи возбудителя и срокам инкубационного периода. Впечатляет качество и оригинальность авторских микропрепаратов и рисунков. Приведены дефиниции заболеваний, краткие свойства возбудителей, особенности микробиологической диагностики и профилактики инфекций, а также данные по основным разделам иммунологии и аллергологии, включая реакции антиген — антитело.

Глава «Мир микробов» посвящена классификации и номенклатуре микробов.

Глава «Микробиологическая диагностика» содержит сведения о методах микробиологической диагностики, последних особенностях классификации мира микробов, новых таксономических категориях.

В главе «Бактериология» приведены сведения, соответствующие новым данным по бактериологии и последним изданиям руководства Берджи (2001—2012 гг.). Эта глава содержит 140 препаратов и рисунков. Приведены данные о филумах бактерий, имеющих медицинское значение (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Chlamydiae* и *Verrucomicrobia*). Описаны новые аспекты морфологии и физиологии бактерий, взаимодействия бактерий с бактериофагами (в том числе CRISPR-система), культивирования, генетики и секреторных систем бактерий. Особый интерес представляют сведения по микрофлоре тела человека и санитарной микробиологии. В разделе частной микробиологии представлены современные данные по условно патогенным и патогенным бактериям.

Глава «Вирусология» соответствует современным данным по таксономии вирусов. Здесь помещены оригинальные схемы строения и репродукции практически всех вирусов и прионов, имеющих медицинское значение. Глава удачно иллюстрирована 74 рисунками.

Глава «Протозология» содержит краткие новые сведения и 38 цветных иллюстраций по амебам, лейшманиям, трипаносомам, лямблиям, трихомонадам, плазмодиям малярии, токсоплазмам, саркоцистам, изоспорам, криптоспоридиям, циклоспорам, бабезиям и балантидиям.

Глава «Микология» представлена современной классификацией грибов и иллюстрирована 43 оригинальными рисунками и препаратами. В этой главе кроме традиционного рассмотрения грибов как возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний представлены продуценты микотоксинов, в частности афлатоксинов, обуславливающих хронические и острые пищевые микотоксикозы. Дана новая информация по пневмоцистам и микроспоридиям.

Глава «Иммунология и аллергология» включает 96 иллюстраций. Она содержит современные обобщенные данные по структуре иммунологии, антигенам, клеточным и гуморальным факторам врожденного иммунитета, антителам, формам иммунного ответа, особенностям иммунитета при различных патологических состояниях, методам оценки иммунного статуса, по иммуномодуляторам и реакциям антиген-антитело. Описана недавно обнаруженная важная группа лимфоцитов, защищающая ткани от повреждений и инфекций (лимфоциты врожденного иммунитета, или лимфоидные клетки врожденного иммунитета, ILCs). Достоинством работы является четкое описание и конструкция рисунков, касающаяся роли субпопуляций макрофагов, дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, а также лимфоцитов врожденного иммунитета (ILC1, ILC2 и ILC3).

Аналогов данного издания как по дизайну, так и по содержанию и комплексности ранее не было, кроме предшествующей работы тех же авторов (Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии, МИА, 2008). Новое издание по актуальности, новизне, информативности значительно расширяет возможности учебников и руководств по медицинской микробиологии и иммунологии. Оно может с успехом использоваться в сфере медицинского образования в ВУЗах, колледжах и училищах, а также как справочник для врачей и специалистов лабораторий соответствующего профиля.

Кафарская Л.И. (М о с к в а)

СОДЕРЖАНИЕ (CONTENTS)

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НОРМОФЛОРЫ И ХОЗЯИНА (SYMBIOTIC INTERACTIONS OF NORMAFLORA AND A HOST)

- Андрющенко С.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Бекпергенова А.В.* Генетическая характеристика адаптивного потенциала бифидобактерий биотопа дистального отдела кишечника человека 4
- Andryuschenko S.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bukharin O.V., Bekpergenova A.V.* Genetic characteristics of the adaptive potential of bifidobacteria in the biotope of distal human intestine
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А., Петрова О.А., Ганина Е.Б.* Метаболическая активность высокоантагонистических штаммов лактобацилл здорового человека 11
- Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Belyaeva E.A., Petrova O.A., Ganina E.B.* Metabolic activity of high-antagonistic strains of lactobacilli isolated from healthy people
- Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Боронина Л.Г.* Результаты определения видового состава лактобацилл при использовании молекулярно-генетических и культуральных методов исследования 17
- Voroshilina E.S., Zornikov D.L., Boronina L.G.* Results of determining the species composition of vaginal lactobacilli using real-time pcr testing and bacteriological method
- Сгибнев А.В., Кремлева Е.А.* Модификация ферментативной и антибактериальной активности лизоцима метаболитами вагинальных лактобацилл 21
- Sgibnev A.V., Kremleva E.A.* Vaginal lactobacilli regulate the activity of muramidase via hydrogen peroxide and surfactants
- Шевченко А.В., Медведева О.А., Мухина А.Ю., Королев В.А., Калуцкий П.В.* Состав нормобиоценоза толстого кишечника и прооксидантно-антиоксидантный баланс плазмы крови, колоноцитов при экспериментальном дисбиозе и использовании пробиотика РиоФлора Иммуно Нео 27
- Shevchenko A.V., Medvedeva O.A., Mukhina A.Yu., Korolev V.A., Kalutsky P.V.* Large intestine normobiocenosis and prooxidant-antioxidant balance of colonocytes, blood plasma in experimental disbioosis and usage of RioFlora Immuno Neo probiotic
- Семин Е.Г., Синяшина Л.Н., Медкова А.Ю., Каратаев Г.И.* Конструирование рекомбинантных аттенуированных бактерий *Bordetella pertussis* генотипа ptxP3 33
- Semin E.G., Sinyashina L.N., Medkova A.Yu., Karataev G.I.* Construction of recombinant attenuated *Bordetella pertussis* bacteria of ptxP3 genotype

ИНФЕКТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ (INFECTOLOGICAL MECHANISMS OF SYMBIOTIC INTERACTIONS)

- Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Бондаренко Т.А., Смолягин А.И.* Иммунорегуляторный профиль микросимбионтов кишечного биотопа человека 42
- Bukharin O.V., Chainikova I.N., Ivanova E.V., Perunova N.B., Bondarenko T.A., Smolyagin A.I.* Immunoregulatory profile of microsymbionts of the intestinal human biotope
- Шишкова Ю.С., Долгушина В.Ф., Графова Е.Д., Завьялова С.А., Курносенко И.В., Евстигнеева Н.П., Громакова К.Г., Колесников О.Л., Чукичев А.В., Долгушин И.И.* Взаимосвязь функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета у беременных женщин с видовым составом лактофлоры 51

<i>Shishkova Yu.S., Dolgushina V.F., Grafova E.D., Zavyalova S.A., Kurnosenko I.V., Evstigneeva N.P., Gromakova K.G., Kolesnikov O.L., Chukichev A.V., Dolgushin I.I.</i> Cervical mucus neutrophils functional status interaction with the species composition of vaginal lactobacilli in pregnant women	
<i>Гриценко В.А., Мавзютов А.Р., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П.</i> Генетический профиль <i>Staphylococcus aureus</i> , выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией.	56
<i>Gritsenko V.A., Mavzyutov A.R., Pashkova T.M., Kartashova O.L., Tyapaeva Ya.V., Belozertseva Yu.P.</i> Genetic profile <i>Staphylococcus aureus</i> , isolated from bacterial carriers and patients with infectious inflammatory pathology	
<i>Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Тимофеева А.В.</i> Микробный консорциум и окситоцин в социальном поведении детей с расстройствами аутистического спектра	62
<i>Burmistova A.L., Filippova Yu.Yu., Timofeeva A.V.</i> Microbial consortium and oxytocine in the social behavior of children with autism spectrum disorders	
<i>Кулаков Ю.К.</i> Молекулярные механизмы персистенции возбудителя бруцеллеза.	68
<i>Kulakov Yu.K.</i> Molecular mechanisms of <i>Brucella</i> persistence	68
<i>Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Савинков П.А., Бошнян Р.Е., Лысенкова М.Ю., Корниенко М.Н., Бурмистров Е.М., Веселовский П.А., Солдатова И.А.</i> Зависимость выявления маркеров оппортунистических инфекций от приверженности АРВТ у детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями.	76
<i>Rybalkina T.N., Karazhas N.V., Savinkov P.A., Boshyan R.E., Lysenkova M.Yu., Kornienko M.N., Burmistrov E.M., Veselovsky P.A., Soldatova I.A.</i> Dependence of detection of markers of opportunistic infections from adherence to antiretroviral therapy in children born by hiv-infected matters	

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИРОДНЫХ СИМБИОЗОВ (MEDICOBIOLOGICAL ASPECTS OF NATURAL SYMBIONTS)

<i>Немцева Н.В., Гоголева О.А., Игнатенко М.Е.</i> Биомедицинский потенциал альгобактериальных симбиозов.	82
<i>Nemtseva N.V., Gogoleva O.A., Ignatenko M.E.</i> Biomedical potential of algobacterial symbioses	
<i>Селиванова Е.А., Хлопко Ю.А., Гоголева Н.Е., Плотников А.О.</i> Детекция потенциально патогенных бактерий в солоноватых реках Приэльтона методом высокопроизводительного секвенирования	87
<i>Selivanova E.A., Khlopko Yu.A., Gogoleva N.E., Plotnikov A.O.</i> Detection of potentially pathogenic bacteria in the brackish rivers flowing into the Elton Lake by high-throughput sequencing	
<i>Яценко-Степанова Т.Н., Игнатенко М.Е.</i> Потенциально опасные Цианобактерия лечебных грязей.	95
<i>Yatsenko-Stepanova T.N., Ignatenko M.E.</i> Potentially dangerous Cyanobacteria of therapeutic mud	
<i>Капков В.И., Васильева С.Г., Лобакова Е.С.</i> Сукцессии цианобактерий в водоемах бореальной зоны	100
<i>Kapkov V.I., Vasilieva S.G., Lobakova E.S.</i> Succession of cyanobacteria in boreal waters	
<i>Шапиро Т.Н., Дольникова Г.А., Немцева Н.В., Санджиева Д.А., Лобакова Е.С.</i> Идентификация и физиологическая характеристика консорциума углеводород окисляющих бактерий нефти и нефтепродуктов	107
<i>Shapiro T.N., Dolnikova G.A., Nemtseva N.V., Sandzhieva D.A., Lobakova E.S.</i> Identification and physiological characterization of a consortium of hydrocarbon-oxidizing bacteria of oil and oil products	
<i>Собянин К.А., Сысолятина Е.В., Чаленко Я.М., Лаврикова А.Я., Калинин Е.В., Пушкарева В.И., Ермолаева С.А.</i> Роль природных вариантов факторов инвазии <i>Listeria monocytogenes</i> в перинатальном листериозе.	114

Sobyenin K.A., Sysolyatina E.V., Chalenko Ya.M., Lavrikova A.Ya., Kalinin E.V., Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. The role for naturally occurring variants of *Listeria monocytogenes* invasion factors in perinatal listeriosis

Тартаковский И.С., Груздева О.А., Карпова Т.И., Дронина Ю.Е., Тарасова Т.А., Логинова О.Г., Дмитриева М.Н. Анализ эффективности различных методических подходов, направленных на элиминацию планктонных клеток и биопленок легионелл в потенциально опасных водных системах 119

Tartakovsky I.S., Gruzdeva O.A., Karpova T.I., Dronina Yu.E., Tarasova T.A., Loginova O.G., Dmitrieva M.N. The analysis of the different methodical approaches directed on the elimination of plankton forms and *Legionella* biofilms from potentially dangerous water systems

РЕЦЕНЗИИ И КРИТИКА (BOOK REVIEWS AND CRITIQUE)

Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство . . . 124

Вниманию авторов!

Благодарим всех, кто подписался на ЖМЭИ на II полугодие 2018 г.

Статьи посылать: meh.inst@mail.ru (Институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова).

Редколлегия, Редакция.