Бактериоцины: перспективы, использование в России и за рубежом

Абрамова Е.С.

Абстракт

В реферате анализируется возможность использования бактериоцинов в качестве замены антибактериальных препаратов. Представлена современная классификация бактериоцинов, их свойства и механизмы действия. Описываются преимущества и недостатки бактериоцинов в качестве альтернативных антибактериальных препаратов. Рассматриваются варианты применения бактериоцинов в антимикробной терапии, а также способы их промышленного получения.

Введение

Быстрое нарастание устойчивости бактерий к антибактериальным препаратам ставит под угрозу эффективность терапии антибиотиками, а как следствие и жизнь многих пациентов. Антибиотики не всегда удовлетворяют необходимым химиотерапевтическим и фармакологическим свойствам, а также обладают рядом побочных эффектов таких, как: токсические реакции (прежде всего, поражения печени и почек), дисбактериозы, что может стать причиной вторичных эндогенных инфекций. Хорошо известны и аллергические реакции, провоцируемые антибиотиками, а также их иммунодепрессивное действие. Длительное применение того или иного антибиотика приводит к появлению устойчивых к нему форм микроорганизмов, и они становятся невосприимчивыми к его действию.

В настоящее время учёные многих лабораторий мира изучают пути и способы направленного синтеза бактериоцинов с целью получения биологическим путем различных модификаций уже известных бактериоцинов, но с более ценными свойствами или же получить новые

природные сбалансированные бактериоциногенные комплексы, безопасные для использования в качестве биоконсервантов.

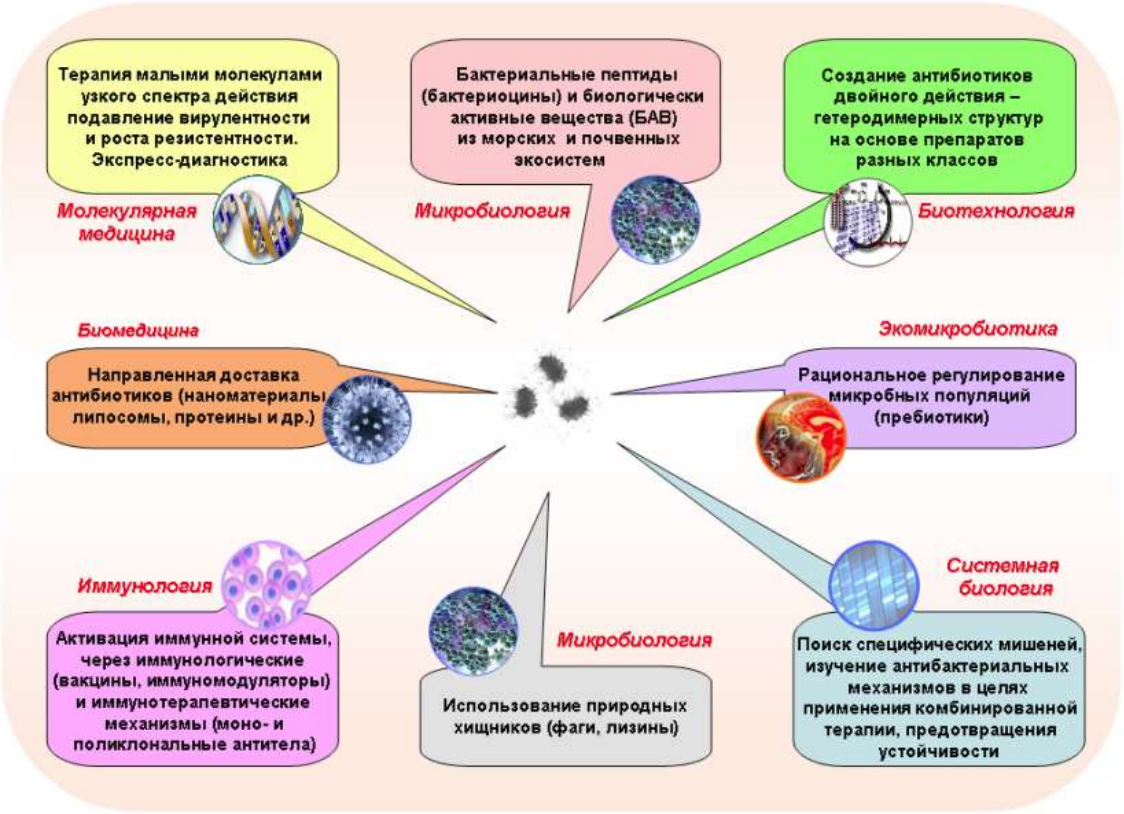

Рис. 1. Современные инновационные антибактериальные практики – потенциальные альтернативы традиционной антибиотикотерапии [1]

Выделение новых бактериоцинов, способных более эффективнее ингибировать развитие возбудителей острых кишечных инфекций, а также микроорганизмов, вызывающих порчу пищевых продуктов, является актуальной задачей современной науки и ее прикладных направлений.

Бактериоцины: классификация, их свойства и механизмы действия

В процессе жизнедеятельности для защиты и конкурентной борьбы за пространство и питательные вещества с другими филогенетически родственными бактериями одного и того же вида или рода микроорганизмы синтезируют специфические пептиды с антимикробной активностью. Они способны убивать родственные виды или штаммы, тормозить их рост, или же иметь более широкий спектр антибактериального действия. Эти вещества

впоследствии были отнесены к классу антимикробных пептидов (AMP) и получили название ***бактериоцинов***.

Бактериоциногения - биологический феномен, широко распространенный в природе и связанный с антагонизмом у бактерий [2]. Некоторые авторы считают, что бактериоциногения - явление закономерное для большинства, если не для всех видов бактерий, а отсутствие сведений объясняется недостатком исследований.

Спектр антимикробной активности бактериоцинов несколько уже, чем у антибиотиков, поскольку определяется наличием рецепторов у бактерий-мишеней для их адсорбции [3]. Особенно это характерно для веществ, выделенных из грамотрицательных бактерий. Для бактериоцинов грамположительных бактерий характерен более широкий спектр действия.

Образование бактериоцинов установлено у следующих родов грамположительных бактерий: *Bacillus, Clostridium, Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus, Lactobacillus, Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium, Mycobacterium, Streptomyces*.

Характеристика бактериоцинов, образуемых грамположительными бактериями, приведена в табл. 1. В табл.2 приведена характеристика бактериоцинов, продуцируемых грамотрицательными бактериями.

Таблицы 1 и 2 составлены по информации из работы [4].

Классифицируют бактериоцины по механизму их действия на клетку (табл. 3), схематичное изображение механизмов представлено на рис. 2.

Бактериоцины ингибируют рост целевых организмов, функционируя главным образом на клеточной оболочке и влияя на экспрессию генов и выработку белка в клетках.

Среди представителей облигатной микробиоты человека в настоящее время достаточно хорошо изучен спектр бактериоцинов у молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus*.

Таблица 1. Бактериоцины, образуемые грамположительными бактериями

Название	Продуцент	Характеристика бактериоцина
Диацетин B-1	*Lactococcus lactis*	Активность проявляет проти *Listeria, P.acidilactici, S.aureus, L.plantarum*
Курвацин FS47	*Lactobacillus curvatus* FS47	Активность проявляет против *p.Listeria*
Мутацин МГ6223	*Streptococcus mutans*, *S.sobrinus* МГ6223	Термостабилен, чувствителен к протеолитическим ферментам, активен против ряда грамположительных бактерий, молекулярная масса 3,5 кДа.
Низин	*Lactococcus lactis*	Термостабилен, устойчив в кислых средах; грамположительные бактерии (стафилококки, стрептококки и др.), многие спорообразующие и некоторые кислотоустойчивые бактерии
Педиоцин N5P	*Pediococcus pentosaceus*	Проявляет активность против *p.Listeria*
Плантарицин А и С	*Lactobacillus plantarum*	Широкий спектр действия, термостабилен, установлена его аминокислотная последовательность, молекулярная масса 3,5 кДа.
Сакацин 674	*Lactobacillus sake* Lb674	Проявляет активность против *p.Listeria*
Энтерококцин	*Enterococcus faecium*	Проявляет активность против *p.Listeria*
Энтероцин А	*Enterococcus faecium*	Вещество содержит 47 аминокислотных остатков, включая 4 остатка цистеина, образующего дисульфидные мостики, молекулярная масса составляет 4,289 кДа
Энтероцин 4	*Enterococcus faecalis* INIA4	Широкий спектр действие, нетоксично при введении животным, подавляют развитие Clostridium septicum у морских свинок; активен против грамположительных бактерий.

Таблица 2. Бактериоцины, образуемые грамотрицательными бактериями

Название	Продуцент	Характеристика бактериоцина
Галоцин Н-6	*Haloferax gibbonsii* 239	Термоустойчив, чувствителен к ряду протеаз, молекулярная масса составляет 32 кДа
Клебоцины	Род *Klebsiella*	Они подавляют развитие представителей энтеробактерий (*Klebsiella, Enterobacter, Shigella, Proteus, Escherichia*), кроме того, к ним оказались чувствительными бактерии родов *Erwinia* и *Pseudomona*s.
Колицины	*Escherichia coli*	Подавляют развитие штаммов-продуцентов и других энтеробактерий; разрушаются протеазами, термоустойчивы
Пиоцины	Род *Pseudomonas*	Нашел применение в онкологической практике - неоцид, который по своим свойствам является бактериоциноподобным веществом
Бактериоцин	*Rhizobium leguminosarum*	Образуемое вещество активно против бактерий этого же вида, но не действует на *Azotobacter* или *Azospirillum*

Таблица 3. Функциональная классификация и механизмы действия бактериоцинов [5]

Бактериоцины	Варианты рецепции	Действие на клетку-мишень
Класс I (термоустойчивые пептиды с мол.массой менее 10 кДа)	В ряде случаев рецептором является предшественником пептидогликана – липид II	Формирование пор в бактериальной мембране, ингибирование активности бактериальных ферментов
Класс II (термоустойчивые пептиды с мол.массой менее 10 кДа)	Связываются с рецептором маннозной трансферазы	Увеличение проницаемости мембран за счет формирования ион-избирательных пор
Класс III (термолабильные белки с мол. массой более 30 кДа)	Мало изучена	Расщепление пептидогликана клеточной стенки бактерий, выход АТФ из клеток

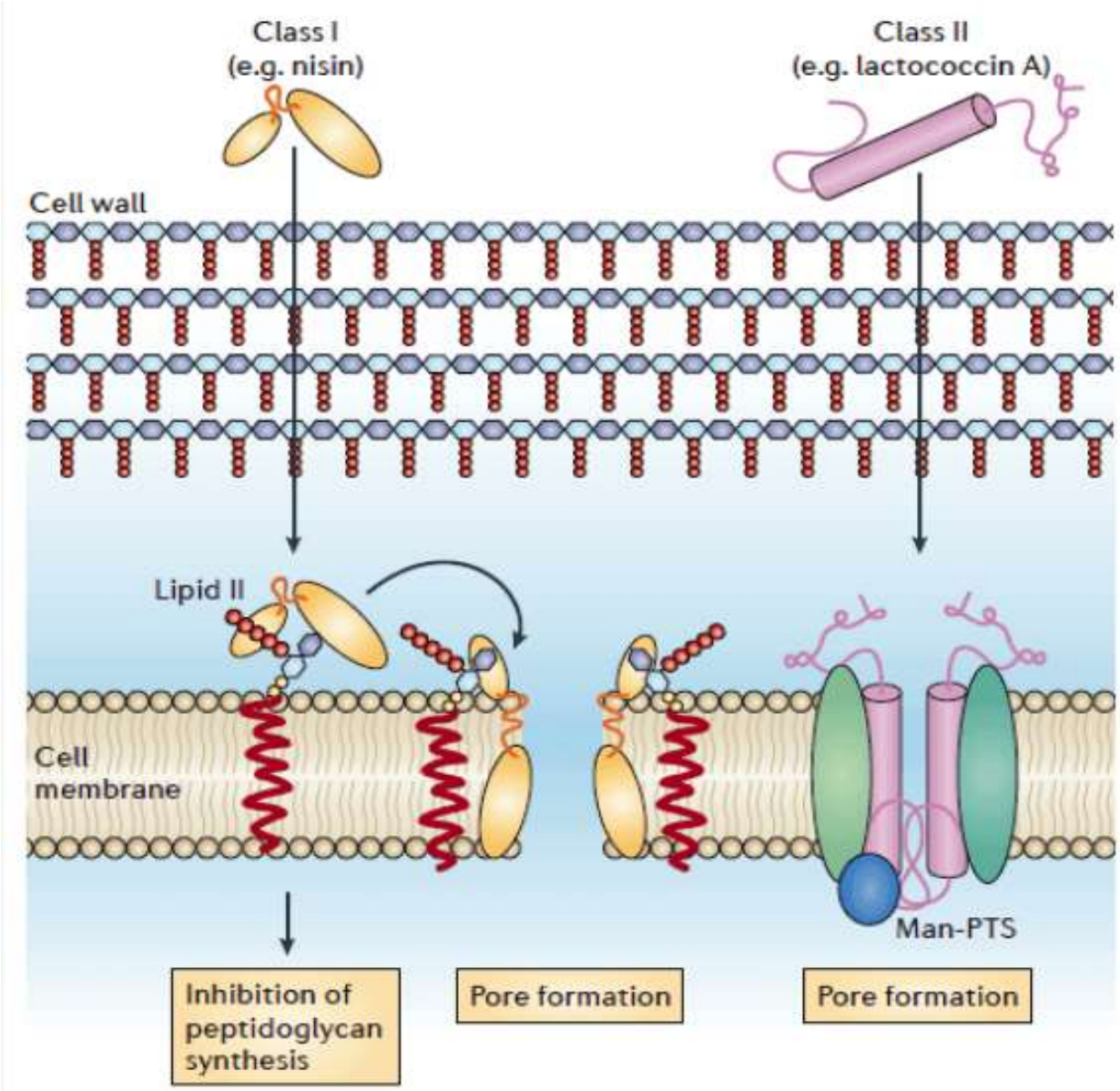

Рис. 2. Механизмы действия бактериоцинов (бактериоцины класса I (низин) ингибируют синтез пептидогликана, связываясь с липидом II, и образуют поры; бактериоцины класса II, такие как лактококцин A, связываются с порообразующей рецепторной маннозо-фосфотрансферазной системой (Man-PTS)) [6].

Синтез бактериоцинов представителями нормальной микробиоты рассматривается как один из механизмов quorum sensing, позволяющего бактериям общаться, координировать свои действия и синхронизировать групповое поведение за счет секреции диффундирующих сигнальных молекул [7], что в свою очередь рассматривает поведение бактерий в биопленках.

Благодаря исследованиям пространственной структуры (рис.3) выявлены закономерности действия бактериоцинов со следующими структурами и системами: системой посттрансляционного процессинга и секреции [8], билипидным слоем [9, 10], собственным С-концевым фрагментом [11-13].

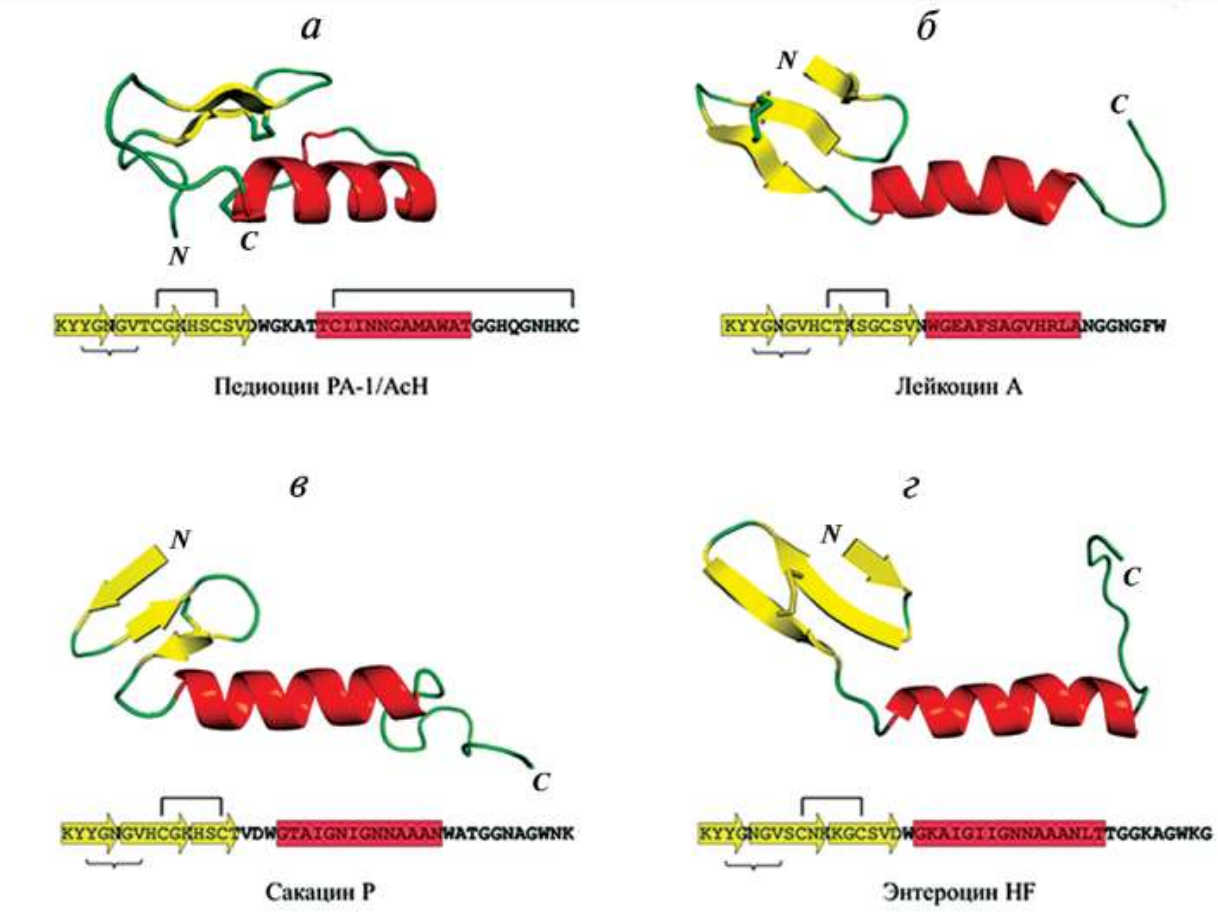

Рис. 3. Пространственная структура представителей подкласса IIa бактериоцинов грамположительных бактерий

Достоинства и недостатки бактериоцинов по сравнению с антибиотиками

1. Достоинства бактериоцинов:

– В отличие от антибиотиков, которые подавляют метаболизм или биосинтез у бактерий, действие бактериоцинов часть сопровождается повреждением структур клеточной стенки, мембраны и гибелью клетки-мишени, что в свою очередь снижает развитие устойчивости;

– Высокая активность (эффективность наблюдается в наномолярных растворах);

– Низкая токсичность определяется возможным полным расщеплением в организме человека (исключение цитолизины, которые активны по отношению к эукариотам);

– Белковая природа (получение с помощью биоинженерии).

2. Недостатки бактериоцинов:

– При пероральном приеме происходит их протеолитическое расщепление (это может быть решено с помощью инкапсуляции или же найдена работа по парентеральному введению препарата [14]);

– Нестабильность в условиях колебания нейтральных и щелочных pH (однако и эта проблема решаема биоинженерией – получением субстанций с активностью в щелочных значениях pH [15]);

– Достаточно узкий антимикробный спектр действия (возможно применение в комбинации с антимикробными препаратами).

Возможность использования бактериоцинов в антимикробной терапии за рубежом

К настоящему времени накоплен большой опыт применения бактериоцинов в пищевой промышленности [16, 17], медицине [18] и ветеринарии.

Наиболее используемые в пищевой индустрии в качестве биопрепаратов являются лантибиотики, синтезированные из молочнокислых бактерий и получившие в Американском управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) и Европейском агентстве по лекарственным средствам (EMA) статус GRAS (безопасные). Некоторые виды лантибиотиков обладают свойствами, которые позволяют применять их для лечения инфекций ЖКТ, вызванных *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* и *Salmonella* [19-20].

Высокая специфичность антибактериальных свойств и безопасность лантибиотиков для организма обусловили широкое использование некоторых из них (низин A и F, мерсацидин, мутацин 1140, лактацин 3147 и педиоцин AcH / PA-1) в качестве лечебных и профилактических биопрепаратов [14, 21-22].

Результаты экспериментальных исследований [21] показали, что низин F (выпускается в настоящее время под торговыми марками Nisaplin в США и Nisin Vega в Китае) ингибировал рост *S. aureus* у инфицированных мышей в течение 15 мин после введения, а клинические испытания при лечении мастита у восьми женщин показали значительное снижение количества *S. aureus* в грудном молоке и полное выздоровление спустя 14 дней.

Исходя из исследований [14, 21], лактоспорулин, продуцируемый *Brevibacillus sp.*, оказался устойчивым к высоким температурам (до 120°C), толерантным к изменениям pH 2-10 и действию протеаз. При этом изменения этих параметров окружающей среды не влияли на его широкую антибактериальную активность как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, таких как *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa*. Таким образом, лактоспорулин является инновационным бактериоцином широкого спектра действия с потенциальными возможностями для лечения нескольких бактериальных инфекций.

Рамопланин – продукт нерибосомального синтеза в микроорганизмах рода Actinomycetes spp. Механизм действия основан на связывании с предшественником бактериальной стенки липидом II. На данный момент находится на клинических испытаниях фазы III в качестве антибиотика против инфекций дыхательных путей (в первую очередь, стафилококков) [23].

В статье [5] приводится обзор применения комбинации «бактериоцин – антибиотик». Необходимо учитывать их путь введения и исследовать физико-химическую природу взаимодействия этих веществ.

Инъекционные препараты на основе низина контролируют почти 99,9% бактерий, вызывающих мастит, таких как *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* после введения препарата [24].

Бактериоцин 1.0320 из *Lactobacillus rhamnosus* [25] может образовывать поры на поверхности клеточной мембраны, повышать проницаемость клеточной мембраны, рассеивать потенциал цитоплазматической мембраны и трансмембранный градиент pH, разрушать целостность клеточной мембраны, вызывая вытекание клеточного содержимого и гибель клеток.

Бактериоцин ZFM54 [26] обладал высокой термостабильностью, активен в кислой среде, чувствителен к трипсину и протеиназе К, но нечувствителен к α-амилазе, лизоциму, липазе и рибонуклеазе А. Бактериоцин обладал широким спектром ингибирующего действия на многие пищевые патогены, такие как *Salmonella typhimurium, Micrococcus luteus* и *Listeria monocytogenes*. Механизм действия бактериоцина ZFM54 связан с образованием пор клеточной мембраны. Бактериоцин имеет большой потенциал для использования в качестве биологического консерванта в пищевой промышленности.

Бактериоцин JS17 [27] был получен из *Bacillus subtilis* JSX-5, выделенного из ферментов черники (*Vaccinium uliginosum*). Обладает широким спектром антибактериальной активности как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий. JS17 проявлял термостойкость, был очень стабилен при pH 2–10 и был чувствителен к протеиназе K и пепсину. Это указывает на то, что JS17 проявляет белковые свойства и может применяться при высоких температурах и кислотно-щелочных условиях. Минимальная ингибирующая

концентрация и минимальная бактерицидная концентрация JS17 в отношении Escherichia coli составляли 10,56 мкг/мл и 22,03 мкг/мл соответственно. Кроме того, сканирующая электронная микроскопия показала, что JS17 бактерицидно разрушает целостность клеточной мембраны *E. coli*, что приводит к растворению клеток и нарушению проницаемости мембран. В этом исследовании впервые был выделен бактериоцин *B. subtilis* из фруктовых ферментов, что свидетельствует о возможности использования JS17 в качестве пищевого биоконсерванта.

Использование бактерицинов в России

Считается, что бактериоцины можно использовать в качестве естественных консервантов продуктов питания. Один из них, а именно *низин*, выделяют из бактерии *Streptococcus lactis* и уже используют в коммерческих целях. Его можно встретить в составе на этикетках под именем Е234. *Добавка Е234 является разрешенной для применения в пищевой промышленности в России, Украине и многих других странах.*

Анализ существующих на рынке препаратов бактериоцинов

В табл. 4 приведены производители низина как самого распространенного бактериоцина.

Таблица 4. Производители низина

Название	Состав	Производитель	Фасовка	Цена, руб
«Низаплин»	Низин, хлорид натрия	«Aplin & Barrett Ltd» Великобритания Beaminster, Doset, DT8 3DZ UK, Тел/факс: +44(0)130-886-22-18	ПЭТ бутылка 500 г 1 кг	2850,00 5600,00
«Кризин»	Низин, хлорид натрия	«Chr. Hansen A/S» Дания, Hoersholm, Boge Alle 10 2970, Тел:45-74-74-74	ПЭТ бутылка 200 г 1 кг	1180,00 700,00
«Бизин»	Низин,	«Zhejiand Silver elephant	ПЭТ	1150,00

	хорил натрия	BioEngineering Co., Ltd» Китай High-Tech Industrial Zone, Tiantai, Zhejiand, 317200.	бутылка 200 г 1 кг	5640,00
«Nisin»	Низин, хлорид натрия	**Amtech Biotech Co., Ltd Китай**	1 кг	3990,00

В России производство препаратов на основе бактериоцинов не налажено, рынок представлен только импортными препаратами, что отражается в высоких ценах: «СОЮЗОПТТОРГ» [28], «Агросервер» [29], ООО НПФ «Уралинвест» [30].

Заключение

В заключение можно сказать о том, что, вероятно, в скором будущем появятся новые способы борьбы с инфекционными бактериальными заболеваниями в случае успешного изучения особенностей функционирования бактериоцинов. В связи с увеличением количества антибиотикорезистентных штаммов среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов изучение бактериоцинов как альтернативных антимикробных субстанций является вполне своевременным.

Список литературы

1. Андрюков Б.Г., Недашковская Е.П. Вступая в пост-антибиотиковую эру: перспективные стратегии поиска новых альтернативных стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями // Здоровье. Медицинская экология. Наука, 2018. 3. С.36-50

2. Кудлай Д.Г., Лиходец В.Г. Бактериоциногения // Л: Медицина, 1966. 203с.

3. Блинкова Л.П., Альтшулер М.Л., Дорофеева Е.С., Горобец О.Б. Молекулярные основы продукции и действия бактериоцинов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2007. 2. С. 97-104

4. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение //Fнтибиотики и химиотерапия, 1999. 6. С. 33-40

5. Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Aleksandrova N.A., Ignatova N.I., Belova I.V., Tochilina A.G., Solovyeva I.V. Prospects for using bacteriocins of normal microbiota in antibacterial therapy (review) // Sovremennye tehnologii v medicine, 2019. 11(3). P. 136-145

6. Кассиров И. Бактериоцины – ноухау биомедицины // «БИО/МОЛ/ТЕКСТ» -2017. [Сайт][URL]: https://biomolecula.ru/articles/ bakteriotsiny-noukhau-biomeditsiny#source-11 (дата обращения: 15.05.2021)

7. Gillor O., Ghazaryan L. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials // Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 2007. 2(2). P.115-122

8. Oppegard C., Fimland G., Anonsen J.H., Nissen Meyer, J. The pediocin PA1 accessory protein ensures correct disulfide bond formation in the antimicrobial peptide pediocin PA1 // Biochemistry, 2015. 54. P.2967–2974. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00164.

9. Fimland G., Pirneskoski J., Kaewsrichan J., Jutila A., Kristiansen P.E., Kinnunen P.K.J., NissenMeyer J. Mutational analysis and membraneinteractions of the betasheetlike Nterminal domain of the pediocinlike antimicrobial peptide

sakacin P // Biochimica et Biophysica Acta, 2006. 1764. P.1132–1140, DOI: 10.1016/j.bbapap.2006.04.007

10. Haugen H.S., Kristiansen P.E., Fimland G., Nissen Meyer J. Mutational analysis of the class IIa bacte riocin curvacin A and its orientation in target cell memb ranes // Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74. P.6766–6773. DOI: 10.1128/aem.0106808.

11. Fimland G., Jack R., Jung G., Nes I.F., Nissen Meyer, J. The bactericidal activity of pediocin PA1 is specifically inhibited by a 15mer fragment that spans the bacteriocin from the center toward the Cterminus // Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64. P.5057–5060

12. Yan L.Z., Gibbs A.C., Stiles M.E., Wishart D.S., Vederas J.C. Analogues of bacteriocins: antimicro bial specificity and interactions of leucocin A with its enan tiomer, carnobacteriocin B2, and truncated derivatives // Journal of Medicinal Chemistry, 2000. 43. P.4579–4581. DOI: 10.1021/jm000416n

13. Haugen, H.S., Fimland, G., NissenMeyer, J. Mutational analysis of residues in the helical region of the class IIa bacteriocin pediocin PA1 // Applied and Environmental Microbiology, 2011. 77. P.1966–1972. DOI: 10.1128/aem.0248810.

14. Mathur H., Des F., Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Bacteriocin-antimicrobial synergy: a medical and food perspective // Frontiers in Microbiology, 2017. 8. P. 1205

15. Yuan J., Zhang Z.Z., Chen X.Z., Yang W., Huan L.D. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisin Z and properties of nisin Z mutants // Applied Microbiology and Biotechnology, 2004. 64(6). P.806-815

16. Kohima Kirtonia, Molla Salauddin, Kaushik Kumar Bharadwaj, Siddhartha Pati, Ankita Dey, Mohammad Ali Shariati, Vijay Kumar Tilak, Elena Kuznetsova, Tanmay Sarkar, Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021. 36. 102141. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102141.

17. Warda A., et al. Isolation and properties of antimicrobial substance produced by Sinhorhizobium melilloti from root nodules of Medicago sativa // South Asian Journal of Experimental Biology, 2021. 11(2). DOI: 10.38150/sajeb.11(2).p115-127

18. Sulthana R., Archer A.C. Bacteriocin nanoconjugates: boon to medical and food industry // Journal of Applied Microbiology, 2021. 131(3). P. 1056-1071, DOI: 10.1111/jam.14982

19. Nitsch-Osuch A., Gyrczuk E., Wardyn A. et al. Antibiotic prescription practices among children with influenza // Advances in Experimental Medicine and Biology, 2016. 905. P.25-31

20. Alvarez-Sieiro P., Montalban-Lopez M., Mu D. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family // Applied Microbiology and Biotechnology, 2016. 100. P.2939-2951

21. Mills S., Ross R.P., Hill C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology // FEMS Microbiology Reviews, 2017. 41. P.129-153

22. Oldfield E., Feng X. Resistance-resistant antibiotics // Trends in Pharmacological Sciences, 2014. 35(12). P.664-674

23. Eefjan Breukink, Ben de Kruijff. Lipid II as a target for antibiotics // Nature Reviews Drug Discovery, 2006. 5. P.321-323

24. Kitazaki K., Baba T., Koga Y. et al. The use of nisin A in preventing bovine mastitis infection // Foods and Food Ingredients Journal of Japan, 2010. 215. P. 449–456.

25. Hong Xu, Yongyan Fu, Fei Liu, Zhijing Liu, Jiage Ma, Rui Jiang, Chaonan Song, Zhanmei Jiang, Juncai Hou, Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320 // LWT, 2021. 137. 110338. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110338

26. Pengxin Ye, Jiawen Wang, Manman Liu, Ping Li, Qing Gu, Purification and characterization of a novel bacteriocin from Lactobacillus paracasei ZFM54 // LWT, 2021. 143. 111125, DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111125.

27. Yi-Zhou Xiang, Xin-Yue Li, Hai-Long Zheng, Jun-Yuan Chen, Lian-Bing Lin, Qi-Lin Zhang, Purification and antibacterial properties of a novel bacteriocin against Escherichia coli from Bacillus subtilis isolated from blueberry ferments // LWT, 2021. 146. 111456, DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111456.

28. Группа компаний "Союзоптторг". [Сайт] [URL]: https://soyuzopttorg.com/s/cart (дата обращения: 20.05.2022)

29. «АГРОСЕРВЕР» - российский агропромышленный сервер. [Сайт] [URL]: https://agroserver.ru/b/nizin-685081.htm (дата обращения: 20.12.2021)

30. ООО НПФ «Уралинвест». [Сайт] [URL]: www.ufa-uralinvest.ru/konservant-nizin.htm (дата обращения: 20.05.2022)