

В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, М.В. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

БАКТЕРИОФАГИ И МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ. ОБЗОР

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

В обзоре литературных и собственных данных рассмотрен потенциал использования бактериофагов в медицинской микробиологии (особенно в случаях множественной лекарственной устойчивости патогенов) и промышленной биотехнологии (в связи с необходимостью деконтаминации и стабилизации пищевых продуктов). Отмечены перспективы бактериофагов в энзимотерапии.

Ключевые слова: бактериофаги, молочнокислые бактерии, антипатогенное действие

BACTERIOPHAGES AND LACTIC ACID BACTERIA. LITERATURE REVIEW

V.M. Lakhtin, A.V. Aleshkin, M.V. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow

The review of literature and own data analysis describe bacteriophages application for medical microbiology (especially in cases of multiple drug resistance of pathogens) and industrial biotechnology (the problems of decontamination and stabilization of foods). Prospects of bacteriophages for enzyme therapy are underlined.

Key words: bacteriophages, lactic acid bacteria, anti-pathogen action

Для молочнокислых бактерий (МКБ) характерны коммуникативные связи в направлениях «Микроб — Микроб» и «Микроб — Хозяин» [1]. Многие коммуникационные взаимосвязи между бактериями опосредуются участием бактериофагов (далее — фагов). Все больше привлекают внимание исследователей фаговая или лизинговая терапия в отношении грамположительных инфекций, фаговые стратегии в синтетической биологии лекарственных препаратов [10, 13, 22, 30, 32]. Фаговые препараты рассматриваются как пробиотики и энзимбиотики, а цитоэндолизины — как новый класс антибактериальных агентов [13, 24, 30].

Особенно хорошо исследованы фаги лактококков и лактобацилл. Накоплен большой опыт по модельным взаимоотношениям между фагами и пробиотическими бактериями. Существующие базы данных о фагах, как стандартизированных носителях генетической информации, упрощают возможности направленного их использования [10]. Среди описанных фагов лактобацилл большинство принадлежит к семействам *Siphoviridae* и *Myoviridae* [37]. При этом наиболее изучены фаги, инфицирующие *Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* и/или *L. gasseri*. В настоящее время доступны 9 полных геномов фагов лактобацилл [37].

Лактобациллы стали моделью взаимоотношений фагов и пробиотических бактерий в связи с имеющими место при ферментации молочных продуктов лизогенными процессами, когда бактерии несут индуцируемые профаги [1, 23]. Стартовые культуры и изолированные МКБ часто используются как естественные источники фагов [23]. Фаги являются универсальным доставочным резервуаром генетического материала: генов протеогликангидролизующих ферментов (селективных лизинов патогенов), вакцинных и других антигенов

патогенов (как усилителей иммунного ответа), лекарственных белковых ингредиентов (антительных фрагментов с выбранным типом действия, например антиротавирусных в составе *L. paracasei* [25]). Многие умеренные фаги лактобацилл и других МКБ индуцируются митомицином-С, что позволяет получать фаги в необходимых количествах, а также управлять клеточным лизисом [28]. Фаги могут иметь важное значение и для таксономического положения бактерий, благодаря их коэволюции с геномом, например, лактобацилл [11]. Для лактобацилл и ряда других МКБ характерны лямбда-подобные фаги [14].

Проблема недопущения переключения лизогенного штамма МКБ на путь автолиза пробиотической культуры является актуальной в молочной промышленности. Штаммы *L. casei*, *L. paracasei* и *L. rhamnosus*, содержащие индуцируемые профаги, обычно исключаются из состава коммерческих продуктов [23]. В связи с этим важными являются: а) выявление МКБ как носителей фагов; б) создание физических (ультрафиолетовое облучение, пастеризация и другие варианты прогрева) и химических условий инактивации фагов в культуре. Например, фаги *L. paracasei* и *L. helveticus* и других КМБ инактивируются при гомогенизации в условиях высокого давления, специальных температурных режимов, в присутствии надуксусной кислоты или химических биоцидов групп А (хлорид четвертичного аммония), С (щелочная хлоридная пена) и Е (этоксифирированный нонифенол и фосфорная кислота) [31, 34]. Достигается инактивация цитолиза варьированием внесенного в среду углевода (снижение лизиса лактококков при замене глюкозы на галактозу) [33]. Деацетилирование N-ацетилглюкозамина в пептидогликане деацетилазой снижает автолиз у *Lactococcus lactis* в связи с нарушением сорбции фара [29].

Возможности управления фагами обусловлены, в первую очередь, особенностями их узнавания бактериями. Имеет место двухэтапное начальное взаимодействие фага с протеогликаном грамположительных бактерий (обратимое узнавание хвостом фага в процессе сорбции с последующим необратимым каталитическим связыванием) [35]. Подобно паттерновым взаимодействиям между углеводраспознающими агентами (лектинами) и гликоконъюгатными мишенями [4], в случае распознавания фагами важен рецепторный паттерн (декоративная комбинация химических элементов) для эффективной сорбции [27]. Далее могут наблюдаться литическое действие фагов на клетки или интеграция фаговых генов в хромосому бактерий с последующей возможной мультипликацией фага. В случае цитоллиза важна нативность протеогликана как субстрата фаговых муреин-гидролаз [35].

В фаговых технологиях используются детерминанты и факторы лектин-гликоконъюгатных взаимодействий. Например, лактобациллы с фагообусловленной экспрессией фрагмента-С столбнячного токсина (лектина) позволяют усиливать иммунный ответ [19]. Glc-специфичные лектины могут служить ингибиторами сорбции фага LL-N на липотейхоевую кислоту *L. delbrueckii* [27]. Гликозилирование липотейхоевой кислоты позволяет регулировать сорбцию фага (Gal-содержащая липотейхоевая кислота лактококков действует как ингибитор сорбции фага на лактококки) [18]. Сиалидаза (распознающая сиаловые последовательности) используется как ключевой элемент фаговой терапии против штаммов *E. coli* с полисиаловой капсулой типа K1 (необходимой для сорбции фага) [15].

Фаги перспективны против патогенов, например, вызывающих урогенитальные патологии [36]. Фаготерапия возможна и в условиях сформированных биопленок патогенов. Эффективность фагов обусловлена проникновением в глубокие слои биопленок с помощью кодируемых фагами деполимераз [10]. Нашло также применение фага, кодирующего полисахарид-лиазу, для обработки биопленок *P. aeruginosa* [10]. Литические фаги рассматриваются как новый класс антибиопленочных агентов [21].

Ферментам в фаговом цитоллизе отводится главная роль. К цитолизинным ферментам относятся пептидогликан-гидролазы, муреин-гидролазы, различные амидазы, лизоцимы, деполимеразы и другие [5]. Специфичность лизиса бактерий фаговыми лизинами является ключевой характеристикой препарата. Характерна видовая селективность инфицирования лактобацилл фагом. Например, MLC-A инфицирует *L. paracasei* and *L. casei*, но не *L. rhamnosus* или *L. gasseri* [17]. Это может быть связано с особенностями клеточных площадок МКБ для сорбции фага. Максимальная сорбция фагов на лактобациллы обычно достигается в присутствии катионов Ca и Mg (5–10 мМ), 30 °C при pH 5–7 [17]. Катионы Ca (5 мМ) требуются и для нормального ростового цикла фагов *L. casei*. Некоторые лизины обладают широкой специфичностью. Так,

L. helveticus CNRZ 303, например, продуцирует эндолизин Mur-LH (N-ацетилмурамидазу, 40 кД) с литической активностью в отношении термофильных лактобацилл, лактококков, педиококков, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium linens* и *Enterococcus faecium* [28].

Наибольшее внимание исследователей уделено разработке синергидных содержащих фаги комбинаций в антимикробных препаратах: а) фаговых лизинов, синергидных с бактерицинами и антимикробными пептидами, б) химерных рекомбинантных фаговых лизинов, их комбинаций, расширяющих ряд мишеней бактериальных патогенов. Примером может служить синергизм фагового рекомбинантного лизина LysK и лизостафина (бактериоцина *Staphylococcus simulans*), который используется для лизиса метициллин-резистентных *S. aureus* [12]. Интересно, что и литические фаги лактобацилл йогурта, и бактериоцины лактобацилл (как синергидная пара) способны одновременно индуцироваться митомицином-С [8]. Индуцируемые митомицином-С фаги и бактериоцины лактобацилл ингибируют вагинальные лактобациллы [9]. Перспективны антибиотик-заменяющие сочетания фагов с бактериоцинами (в том числе низином лактококка) и антимикробными пептидами [26]. Для фаговой терапии удобны комбинации двух и более типов фагов для достижения эффекта при большем варьировании условий [16]. Например, фаговый коктейль для лизиса *Klebsiella pneumoniae* содержит фаги GH-K1, GH-K2 and GH-K3 [4]. Пневмококковый (*Streptococcus pneumoniae*) автолизин LytA (N-ацетилмурамоил-L-Ala-амидаза) в сочетании с фаговыми лизоцимами Cpl-1 and Cpl-7 проявляли кооперативный эффект в дезинтеграции биопленок *Streptococcus pneumoniae* [20].

В целом, к преимуществам использования фаготерапии относятся: а) селективное устранение патогена без существенного нарушения прочего микробного пейзажа в организме; б) альтернативное заместительное или синергидное применение в сочетании с прочими антимикробными агентами. Многие умеренные фаги лактобацилл и других МКБ индуцируются простыми способами, что позволяет получать их в препаративных количествах [28].

Новые направления и инновационные подходы в биотехнологии и медицине, развивающиеся на основе фаговых вирусных технологий включают конструирование химерных высокоселективных фагов, их комбинаций с учетом конструкций доставки и реализации необходимых активностей. Проводятся работы по инженерии дизайна пробиотиков как средств доставки лекарств [7], осуществляется стратегия рецепторной мимикрии для создания пробиотиков узнавания мишеней — специфических патогенов и токсинов для усиления иммунного ответа [19]. Использование мукозных вакцин на основе фагов обладает функциональными преимуществами (неинвазивностью и легкостью введения в организм). Разрабатываются фаговые препараты в сочетании с пробиотиче-

скими и непровиотическими лактобациллами и бифидобактериями в направлениях противоллергенного, нормализующего микрофлору организма эффектов, устранения грибковых инфекций [2, 3, 6]. Фаговые цитолитины перспективны для генерирования любых внутриклеточных ферментов МКБ, например, ответственных за ароматизацию продуктов [8]. Развивается аспект персонализации лечения с использованием фаготерапии.

В целом на основании вышесказанного можно заключить, что фаговые цитолитические технологии имеют обоснованные долгосрочные перспективы применения и развития в медицинской и промышленной биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунобиологические препараты, перспективы применения в инфектологии / под ред. Г.Г. Онищенко [и др.]. — М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. — 2002. — 608 с.
2. Иммунобиологическое противоллергическое средство (варианты) и штамм *Lactobacillus acidophilus* 100 аш ПА, используемый для производства иммунобиологического противоллергического средства / В.А. Алешкин [и др.] // Патент RU(11) 2 431 663. Опубликовано: 20.10.2011 Бюл. № 29.
3. Композиция для перорального применения, содержащая непатогенные микроорганизмы, обладающая способностью нормализовать микрофлору кишечника (варианты) / В.В. Чалов [и др.] // Патент RU(11) 2008 131 894. Опубликовано: 10.02.2010 Бюл. № 4.
4. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека / М.В. Лахтин [et al.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 1. — С. 27—36.
5. Лектины и ферменты в биологии и медицине / М.В. Лахтин [и др.]. — М.: Династия, 2010. — 496 с.
6. Препарат, содержащий стафилококковый бактериофаг в качестве препарата для лечения кандидоза / Ю.В. Несвижский [и др.] // Патент RU(11) 2 377 006. Опубликовано: 27.12.2009 Бюл. № 36.
7. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего / В.М. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2008. — № 2. — С. 33—44.
8. A.O. Kilig [et al.] Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — Vol. 62. — P. 2111—2116.
9. Analysis of *Lactobacillus* products for phages and bacteriocins that inhibit vaginal lactobacilli / L. Tao [et al.] // *Infect. Dis in Obstetrics & Gynecol.* — 1997. — Vol. 5. — P. 244—251.
10. Azeredo J., Sutherland I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 261—266.
11. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens / B. Burrowes [et al.] // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* — 2011. — Vol. 9. — P. 775—785.
12. Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2008. — Vol. 287. — P. 185—191.
13. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents // *Experimental Biology and Medicine.* — 2006. — Vol. 231. — P. 366—377.
14. Brussow H. Phages of dairy bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2001. — Vol. 55. — P. 283—303.
15. Bull J.J., Vimr E.R., Molineux I.J. A tale of tails: sialidase is key to success in a model of phage therapy against K1-capsulated *Escherichia coli* // *Virology.* — 2010. — Vol. 398. — P. 79—86.
16. Chan B.K., Abedon S.T. Phage therapy pharmacology phage cocktails // *Adv. Appl. Microbiol.* — 2012. — Vol. 78. — P. 1—23.
17. Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei* / M.L. Capra [et al.] // *J. Dairy Sci.* — 2006. — Vol. 89. — P. 2414—2423.
18. Characterization of lipoteichoic acids as *Lactobacillus delbrueckii* phage receptor components / L. Raisanen [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2004. — Vol. 186. — P. 5529—5532.
19. Culligan E.P., Hill C., Sleator R.D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects // *Gut Pathogens.* — 2009. — 1:19 (12 pages). doi:10.1186/1757-4749-1-19. <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/19>
20. Domenech M., García E., Moscoso M. In Vitro Destruction of *Streptococcus pneumoniae* Biofilms with Bacterial and Phage Peptidoglycan Hydrolases // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — Vol. 55. — P. 4144—4148.
21. Donlan R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage // *Trends Microbiol.* — 2009. — Vol. 17. — P. 66—72.
22. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2010. — Vol. 300. — P. 357—362.
23. Garneau J.E., Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories.* — 2011. — Vol. 10 (Suppl 1). — P. 20. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S20. <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/S1/S20>
24. Hermoso J.A., García J.L., García P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 10. — P. 461—472.
25. Integrative expression system for delivery of antibody fragments by lactobacilli / M.C. Martín [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 2174—2179.
26. Joerge R.D. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages // *Poultry Science.* — 2003. — Vol. 82. — P. 640—647.
27. Molecular interaction between lipoteichoic acids and *lactobacillus delbrueckii* phages

depends on D-Alanyl and -Glucose substitution of poly(glycerophosphate) backbones / L. Raisanen [et al.] // J. Bacteriol. — 2007. — Vol. 189. — P. 4135–4140.

28. Mur-LH, the Broad-Spectrum Endolysin of *Lactobacillus helveticus* Temperate Bacteriophage -0303 / S.-M. Deutsch [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — P. 96–103.

29. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis* / M. Meyrand [et al.] // Microbiology. — 2007. — Vol. 153. — P. 3275–3285.

30. Phage treatment of human infections / S.T. Abedon [et al.] // Bacteriophage. — 2011. — Vol. 1, N 2. — P. 66–85.

31. Quiberon A., Suárez V.B., Reinheimer J.A. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments // J. Food Prot. — 1999. — Vol. 62. — P. 894–898.

32. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials / M. Fenton [et al.] // Bioengineered Bugs. — 2010. — Vol. 1. — P. 9–16.

33. Reduced lysis upon growth of *Lactococcus lactis* on galactose is a consequence of decreased binding of the autolysin AcmA / A. Steen [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74. — P. 4671–4679.

34. Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application / D.J. Mercanti [et al.] // Food Microbiol. — 2012. — Vol. 29. — P. 99–104.

35. Studies of the receptor for phage $\alpha 25$ in group A streptococci: the role of peptidoglycan in reversible adsorption / P.P. Cleary [et al.] // J. Exp. Med. — 1977. — Vol. 145. — P. 578–593.

36. The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis / S. Letkiewicz [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 60. — P. 99–112.

37. Villion M., Moineau S. Bacteriophages of *Lactobacillus* // Front Biosci. — 2009. — Vol. 1. — P. 1661–1683.

Сведения об авторах

Лахтин Владимир Михайлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com, e-mail: lakhtinv@yandex.ru)

Алешкин Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)