

Щепитова Н.Е.¹, Сычёва М.В.^{1,2}, Карташова О.Л.²

¹Оренбургский государственный аграрный университет

²Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН

E-mail: nschepitova@mail.ru

СКРИНИНГ ШТАММОВ ЭНТЕРОКОККОВ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ НА ИХ ОСНОВЕ ПРЕПАРАТОВ-ПРОБИОТИКОВ

В условиях борьбы с антибиотикорезистентностью микроорганизмов особое значение приобретает поиск альтернативных традиционным антибиотикам противомикробных средств. Основой для новых антимикробных препаратов могут служить бактериоцины энтерококков. В связи с этим скрининг новых безопасных штаммов-продуцентов энтерококков для получения бактериоцинов является актуальным и перспективным направлением современной микробиологии.

Проведён сравнительный анализ видового разнообразия бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из кишечника здоровых животных разных видов. В популяции фекальных энтерококков установлена широкая распространённость антагонистической активности в отношении бактерий родов *Listeria* и *Enterococcus*, напрямую коррелирующая с наличием генов бактериоциногенности. На модели экспериментальной инфекции показана возможность использования антагонистически активных энтерококков кишечного происхождения в качестве эффективного средства защиты от листериоза.

На основании комплексной оценки фенотипических и генетических характеристик энтерококков, выделенных из кишечника здоровых животных, отобран штамм *Enterococcus faecium*, обладающий генетическими детерминантами бактериоциногенности, выраженным антагонистическим эффектом в отношении листерий и не имеющий факторов вирулентности.

Ключевые слова: *Enterococcus spp.*, антагонистическая активность, бактериоциногенность, факторы вирулентности, экспериментальная инфекция, полимеразная цепная реакция

В поисках решения задачи по изысканию альтернативных традиционным антибиотикам средств, способных обеспечить борьбу с инфекционными агентами, возрос интерес к антимикробным субстанциям бактериального происхождения. Среди них особое место занимают бактериоцины – экскретируемые за пределы бактериальной клетки антимикробные пептиды, чаще всего катионной природы [6], [12], [23].

Явление бактериоциногенности широко распространено среди представителей разных видов рода *Enterococcus* [3]. Перспективным направлением является использование энтероцинов для терапии и профилактики инфекционной патологии, а также для биотехнологических целей в пищевой промышленности [25].

Учитывая вышеизложенное, поиск микроорганизмов-продуцентов бактериоцинов и изучение их биологических свойств представляется актуальным, что и определило цель настоящего исследования – скрининг антагонистически активных штаммов энтерококков и изучение их биологических свойств с целью разработки на их основе препаратов-пробиотиков.

Материалы и методы. В исследовании были изучены 162 штамма бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из фекалий клинически здоровых сельскохозяйственных животных, в том числе 54 – из фекалий крупного рогатого скота;

21 штамм – из фекалий коз; 51 – из фекалий свиной и 36 культур – из фекалий лошадей.

Микроорганизмы выделяли с использованием классических бактериологических методов. Посев исследуемого материала осуществляли на жёлчно-эскулиновый агар с азидом натрия (HiMedia, Индия). При обнаружении характерного для энтерококков роста (образование коричнево-чёрного преципитата вокруг колоний) проводили пересев колоний на агар Шедлера (HiMedia, Индия).

Штаммы идентифицировали с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров по видоспецифическим генам, кодирующим синтез супероксиддисмутазы [15]. Синтез праймеров осуществлен компанией «СИНТОЛ» (г. Москва). Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» («Литех», Россия).

Факторы вирулентности – гемолитическую и желатиназную активности культур *Enterococcus spp.* определяли по методам М.О. Биргера (1982) [7].

Генетические детерминанты известных факторов вирулентности: цитолизина – *cylA*, *cylB*, *cylM*, желатиназа – *gelE*, сериновая протеаза – *sprE*, гиалуронидаза – *hyl*, поверхностные белки, участвующие в адгезии – *asa*,

белки-иммуносупрессоры – *esp*, определяли с помощью ПЦР [11], [27], [29].

Наличие антагонистической активности у бактерий рода *Enterococcus* определяли чашечным методом по принципу отсроченного антагонизма [4]. В качестве тест-культур использовали патогенные и условно-патогенные бактерии: *Listeria monocytogenes* ($n=8$), *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *Staphylococcus aureus* ($n=5$), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* ($n=5$), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella morganii* и грибы рода *Candida* ($n=5$).

Гены, кодирующие синтез известных энтероцинов: энтероцин А – *entA*, энтероцин В – *entB*, энтероцин Р – *entP*, энтероцин AS-48 – *entAS-48*, энтероцин L50A – *entL50A*, энтероцин L50B – *entL50B*, бактериоцин 31 – *bac31*, цитолизина – *cylLs*, *cylLl*, выявляли у энтерококков при помощи гнездовой ПЦР [14].

Изучение *in vivo* антагонистической активности энтерококков проводили на модели экспериментального листериоза. Для воспроизведения экспериментальной листериозной инфекции использовали беспородных морских свинок обоих полов массой 200–250 г. Все эксперименты с животными выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и декларацией о гуманном отношении к животным.

Животные были разделены на две равные группы: опытную ($n=9$) и контрольную ($n=9$). Животным опытной группы в течение 7 дней до заражения задавали один раз в сутки *per os* по 1 мл взвеси суточной культуры энтерококков в изотоническом растворе NaCl, содержащей $1 \cdot 10^9$ микробных клеток.

Для заражения животных обеих групп использовали экспоненциальную культуру *L. monocytogenes* VIMHA 004, отмытую фосфатным буфером и замороженную при -70 °C в 10%-ном глицерине. Концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) в замороженной культуре определяли предварительно по высевам последовательных разведений. Заражение осуществляли введением *per os* штамма в дозе $1 \cdot 10^{10}$ бактерий на морскую свинку.

Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 24 ч, 3 и

5 суток инфекции. Для оценки обсемененности органов *L. monocytogenes* в асептических условиях морских свинок вскрывали и стерильно отбирали внутренние органы: печень с желчным пузырем, целиком селезенку, участок тонкого кишечника длиной 20 мм.

Для бактериологического исследования образцы органов взвешивали, гомогенизировали в фарфоровых ступках со стерильным песком в PBS-буфере (Хеликон, Россия) в соотношении 1:2. Суспензию органов вносили в количестве 1 мл на чашки с агаром для идентификации листерий (PALCAM) (HiMedia, Индия), растирали шпателем Дригальского и инкубировали при 30 °C в течение 48 ч. При обнаружении характерного для листерий роста (серо-зелёные колонии с тёмным центром и тёмным ореолом) проводили микроскопию, подсчитывали число выросших колоний, рассчитывали содержание листерий в 1 г органа.

Полученные в ходе исследований данные были обработаны статистически [1].

Результаты и обсуждение

С использованием метода полимеразной цепной реакции были идентифицированы культуры энтерококков, выделенные из фекалий сельскохозяйственных животных. Так, 45 выделенных штаммов (27,8%) были отнесены к виду *Enterococcus faecium*, 39 культур (24,1%) – к виду *Enterococcus hirae*, 36 изолятов (22,2%) – к виду *Enterococcus durans*, 21 штамм (12,9%) – к виду *Enterococcus faecalis*, 15 штаммов (9,3%) – к виду *Enterococcus flavescens*, 6 культур (3,7%) – к виду *Enterococcus casseliflavus* (рис. 1).

Видовой состав энтерококков, выделенных из фекалий свиней, характеризовался большим разнообразием (рис. 2). В 53,0% случаев выделялись штаммы *E. faecium*, в 35,4% случаев – штаммы *E. hirae*. По три культуры энтерококков было идентифицировано как *E. durans* (5,8%) и *E. casseliflavus* (5,8%). Энтерококки микрофлоры фекалий лошадей были представлены видами *E. faecium* (50,0%), *E. hirae* (25,0%), *E. flavescens* (16,7%) и *E. casseliflavus* (8,3%). Среди культур, изолированных из фекалий крупного рогатого скота, большинство штаммов относилось к видам *E. durans* (61,1%) и *E. faecalis* (33,4%). В трёх случаях был выделен штамм *E. flavescens* (5,5%). Изоляты энтерококков из

фекалий коз в 71,4% случаев принадлежали к виду *E. hirae*, по три изолята (14,3%) – к видам *E. flavescens* и *E. faecalis*.

На следующем этапе работы были изучены некоторые факторы патогенности энтерококков кишечной микрофлоры животных. В результате проведённых исследований нами было установлено, что на фенотипическом уровне *Enterococcus spp.* не обладали гемолитической и желатиназной активностями.

Молекулярно-генетический анализ не выявил в популяции фекальных изолятов энтерококков генетических детерминант известных факторов вирулентности: *cylA*, *cylB*, *cylM* – цитолизин, *gelE* – желатиназы, *sprE* – сериновой протеазы, *hyl* – гиалуронидазы, *asa* – поверхностных белков, участвующих в адгезии.

При исследовании антагонистической активности энтерококков установлено, что 37,0±3,79% выделенных культур подавляли рост вирулентных штаммов *Enterococcus faecalis* и бактерий рода *Listeria*. В отношении остальных культур коллекции микроорганизмов антагонистическая активность бактерий рода *Enterococcus* не выявлена.

Антагонистически активные изоляты энтерококков принадлежали к видам *E. faecium* (30 штаммов), *E. durans* (24 штамма) и *E. flavescens* (6 штаммов). Среди культур вида *E. faecium* доля антагонистически активных штаммов составила 66,6±7,03%, среди *E. durans* – 66,6±7,86%, среди *E. flavescens* – 40,0±12,64%.

Коэффициент антагонистической активности культур *E. faecium* в отношении бактерий *Listeria monocytogenes* составил 7,0±0,42, штаммов *E. durans* – 6,8±0,41, изолятов *E. flavescens* – 6,7±1,55 (рис. 3). Рост *L. innocua* более эффективно подавляли штаммы *E. faecium*, чем культуры *E. durans* ($p < 0,05$). Среднее значение коэффициента антагонистической активности для изолятов вида *E. faecium* составило 7,8±0,36, для *E. durans* – 6,5±0,34, для *E. flavescens* – 7,4±2,22.

По отношению к *L. ivanovii* максимальный антимикробный эффект проявляли штаммы *E. faecium* ($p < 0,001$). Коэффициент антагонистической активности энтерококков варьировал от 5,0±1,57 у культур *E. flavescens* и 5,2±0,45 у штаммов *E. durans* до 8,5±0,17 у изолятов *E. faecium*.

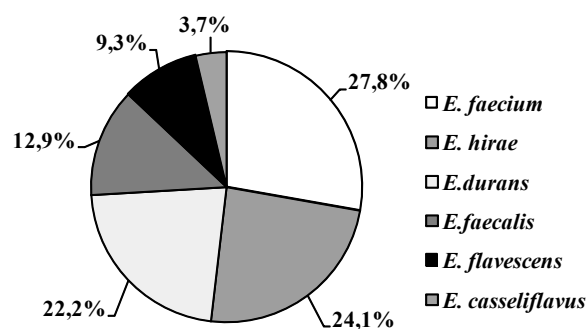


Рисунок 1. Видовой состав фекальных изолятов энтерококков

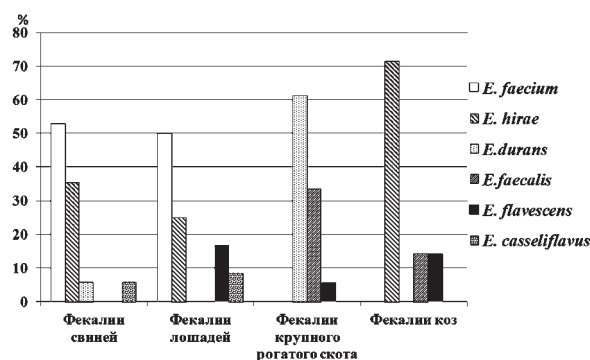
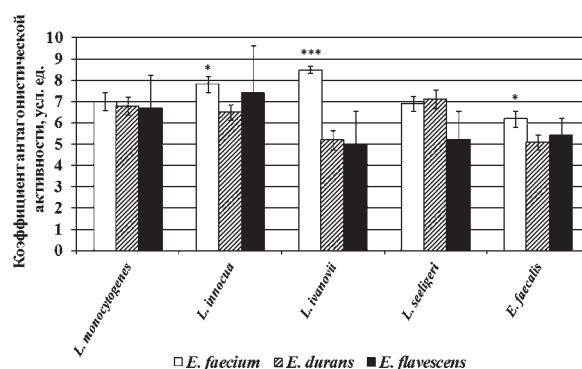


Рисунок 2. Видовой состав фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных разных видов



Примечание: * – достоверность различий выраженности антагонистической активности культур *E. faecium* по сравнению с культурами *E. durans* – ($p < 0,05$); *** – достоверность различий выраженности антагонистической активности культур *E. faecium* по сравнению с культурами видов *E. durans* и *E. flavescens* ($p < 0,001$).

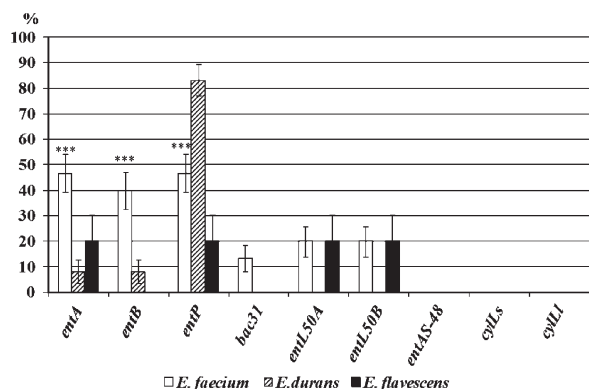
Рисунок 3. Выраженность антагонистической активности культур энтерококков в отношении *Listeria spp.* и *Enterococcus faecalis*

Наибольшей антилистериозной активностью по отношению к *L. seeligeri* обладали штаммы *E. durans* (коэффициент активности $7,1 \pm 0,44$), в меньшей степени ингибировали рост листерий изоляты *E. faecium* (коэффициент активности $6,9 \pm 0,35$). Минимальным значением коэффициента антагонистической активности ($5,2 \pm 1,37$) характеризовались штаммы *E. flavescens*.

В отношении вирулентных штаммов *Enterococcus faecalis* энтерококки обладали менее выраженным антагонизмом, чем к листериям, со средним значением коэффициента антагонистической активности: $6,2 \pm 0,37$ для *E. faecium*, $5,1 \pm 0,35$ для *E. durans* и $5,4 \pm 0,82$ для *E. flavescens*. Активность штаммов *E. faecium* была достоверно выше по сравнению с культурами *E. durans* ($p < 0,05$).

Изучение изолятов энтерококков на наличие генетических детерминант бактериоциногенности показало, что 69 культур ($42,5 \pm 3,88\%$) обладали тем или иным геном, кодирующим синтез энтероцинов. При этом наблюдалась прямая корреляция ($r = 0,891$) между наличием генов бактериоциногенности и проявлением антагонистической активности ($p < 0,001$).

Генетические детерминанты бактериоциногенности были обнаружены у штаммов энтерококков трёх видов: *E. faecium*, *E. durans* и *E. flavescens* (рис. 4).



Примечание: гены кодируют: entA – энтероцин А, entB – энтероцин В, entP – энтероцин Р, bac31 – бактериоцин 31, entL50A – энтероцин L50A, entL50B – энтероцин L50B, entAS-48 – энтероцин AS-48, cyLs и cyLI – литические компоненты цитолизина.

*** – достоверность различий частоты встречаемости генов энтероцинов среди культур *E. faecium*, по сравнению с культурами *E. durans* – ($p < 0,001$).

Рисунок 4. Распространённость генов бактериоциногенности в популяции фекальных изолятов энтерококков

Наиболее разнообразный спектр генов бактериоциногенности представлен у штаммов *E. faecium*. Энтерококки, содержащие в геноме несколько генов бактериоциногенности (три и более), принадлежали к видам *E. faecium* и *E. flavescens*. В геноме двух штаммов *E. faecium* и *E. flavescens* были выявлены комплексы генов продукции энтероцинов (*entA*, *entP*, *entL50A*, *entL50B*). Штамм *E. faecium*, изолированный из фекалий лошади, обладал набором из пяти генов энтероцинов (*entA*, *entP*, *bac31*, *entL50A*, *entL50B*).

На следующем этапе работы нами была предпринята попытка изучения антагонистической активности энтерококков *in vivo* на модели экспериментальной листериозной инфекции.

В качестве штамма-антагониста была выбрана культура *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, изолированная из кишечника свиньи, обладающая выраженным антагонистическим эффектом в отношении бактерий рода *Listeria in vitro* и не имеющая факторов патогенности на фенотипическом уровне.

В ходе проведённых исследований установлено, что заражение морских свинок культурой *L. monocytogenes* VIMHA 004 вызывает развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 33,3% животных контрольной группы. Через сутки после инфицирования погибли две морские свинки, через пять суток пало ещё одно животное контрольной группы. В опытной группе гибель животных от листериозной инфекции не наблюдали.

Этим данным соответствовали и результаты определения показателя микробной обсеменённости (КОЕ/г) внутренних органов у животных исследуемых групп. Количество листерий в органах морских свинок, получавших культуру энтерококков, на третьи и пятые сутки инфекции было достоверно меньше, чем в органах животных контрольной группы (рис. 5).

В обсеменённости листериями селезёнки морских свинок опытной и контрольной групп наблюдалась тенденция к первоначальному увеличению числа бактерий в органе к третьим суткам инфекции с последующим уменьшением количества листерий к последнему дню эксперимента. Спустя 24 часа, бактерии рода *Listeria* из селезёнки животных обеих групп не выделялись. Через трое суток после инфициро-

вания, концентрация листерий в селезёнке животных опытной группы достигала $244,0 \pm 20,72$ КОЕ/г, что в среднем в 1,3 раза меньше таковой в контрольной группе ($p < 0,05$). В опытной группе морских свинок количество листерий в селезёнке на пятые сутки течения инфекции было достоверно ниже ($26,0 \pm 7,42$ КОЕ/г), чем в контрольной группе ($184,0 \pm 16,04$ КОЕ/г) ($p < 0,001$).

Аналогичную тенденцию наблюдали при изучении результатов посевов ткани печени: через сутки после инфицирования концентрация листерий в органе животных контрольной группы достигала $2,0 \pm 0,50$ КОЕ/г, обсеменённость *L. monocytogenes* VIMHA 004 печени животных опытной группы к третьим суткам инфекции составила $236,0 \pm 17,45$ КОЕ/г против $279,0 \pm 12,16$ КОЕ/г в контрольной группе. На пятые сутки от момента заражения в опытной группе животных отмечалось достоверное снижение количества листерий в печени ($9,0 \pm 1,83$ КОЕ/г) по сравнению с контролем ($1305,0 \pm 21,67$ КОЕ/г) ($p < 0,001$).

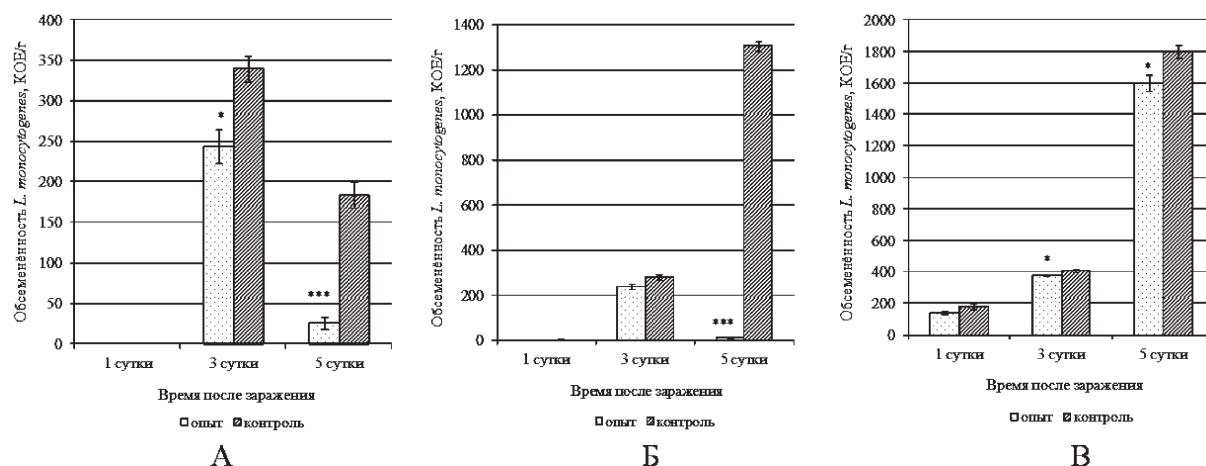
Концентрация листерий в кишечнике и его содержимом у животных обеих групп возрастала с течением времени. При этом степень обсеменённости листериями кишечника и его содержимого у морских свинок на третьи и пятые сутки инфекции была ниже в опытной группе животных ($p < 0,05$). Количество *L. monocytogenes* VIMHA 004 в кишечнике и

его содержимом у животных опытной группы через 24 часа от момента инфицирования достигало $140,0 \pm 11,50$ КОЕ/г (в контрольной группе – $180,0 \pm 20,05$ КОЕ/г). На третьи сутки инфекционного процесса в кишечнике и его содержимом у животных, получавших культуру энтерококков, число листерий составило $377,0 \pm 7,24$ КОЕ/г, в контрольной группе – $407,0 \pm 8,71$ КОЕ/г; на пятые сутки аналогичные показатели для опытной и контрольной групп составили $1600,0 \pm 54,80$ и $1796,0 \pm 39,76$ КОЕ/г, соответственно.

Таким образом, в результате проведённого исследования выявлена способность штамма *Enterococcus faecium* Ef79OSAU снижать летальность и микробную обсеменённость внутренних органов при экспериментальной листериозной инфекции у морских свинок.

Заключение. Анализ результатов проведённых исследований позволил выявить различия видового состава энтерококков фекальной микрофлоры продуктивных животных: энтерококки фекалий моногастричных животных характеризовались большим разнообразием видов, чем у жвачных. Доминирующим видом у полигастричных животных являлся *E. durans*, у лошадей и свиней – *E. faecium*. Изоляты вида *E. faecalis* были обнаружены только в кишечном биотопе жвачных животных.

В настоящее время отсутствует единое мнение относительно доминирования опреде-



Примечание: * – достоверность различий уровня обсеменённости листериями внутренних органов морских свинок в опытной и контрольной группе животных – ($p < 0,05$); *** – ($p < 0,001$).

Рисунок 5. Показатели микробной обсеменённости *L. monocytogenes* VIMHA 004 внутренних органов морских свинок опытной и контрольной групп: А – селезёнка, Б – печень, В – кишечник и его содержимое

лённых видов энтерококков в кишечном био-топе животных. Некоторые авторы указывают, что основными представителями энтерококков в кишечнике крупного рогатого скота, свиней и лошадей являются *E. faecium* [9], другие – *E. faecalis* [24], третьи – *E. hirae* [17]. Предположительно, данные различия могут быть связаны с особенностями рациона и содержания животных в различных регионах. Кроме того, в более ранних работах идентификация энтерококков проводилась на основании биохимических тестов, которые не всегда дают верный результат при исследовании близкородственных видов *Enterococcus spp.* [2], в то время как используемый в нашей работе молекулярно-генетический метод позволяет говорить о более высокой точности результатов идентификации.

Одним из важнейших этапов изучения выделенных культур энтерококков стало выявление возможных факторов патогенности. Известно, что наличие факторов вирулентности у представителей группы потенциально-патогенных микроорганизмов играет ведущую роль в развитии инфекционного процесса [5]. В ходе проведённых исследований нами установлено, что культуры *Enterococcus spp.* не обладали гемолитической и желатиназной активностями на фенотипическом уровне.

В результате молекулярно-генетического исследования в популяции фекальных изолятов энтерококков нами не обнаружено генетических детерминант известных факторов вирулентности (*cylA*, *cylB*, *cylM* – цитолизин, *gelE* – желатиназы, *sprE* – сериновой протеазы, *hyl* – гиалуронидазы, *asa* – поверхностных белков, участвующих в адгезии).

Данные об отсутствии в геноме фекальных энтерококков, выделенных от животных, генетических детерминант факторов вирулентности отличаются от имеющихся в литературе. Так, Qin X. et al. (2001) обнаружили в геноме штаммов *Enterococcus faecalis* OG1RF гены *gelE* и *sprE*, кодирующие желатиназу и сериновую протеазу [8]. В исследованиях С. Sabia et. al. (2007) и F. Biavasco (2007) установлено, что ген, обуславливающий протеолитическую активность (*gelE*) содержат 50% культур *Enterococcus spp.*, выделенных из кишечника животных, причём 11% штаммов обладают желатиназной активностью на уровне фенотипа

[10, 28]. По данным Poeta P. et al. (2006), культуры *Enterococcus spp.* фекальной микрофлоры птиц характеризуются наличием генов *cyl*-оперона (*cylA*, *cylB*, *cylM*) и проявляют β-гемолитическую активность [22].

Отсутствие факторов вирулентности у изученных фекальных культур энтерококков предполагает безопасность их использования в качестве основы пробиотических препаратов и заквасок прямого внесения.

Важным этапом исследования биологических свойств энтерококков микрофлоры фекалий животных является изучение антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

В популяции фекальных энтерококков установлена широкая распространённость генов бактериоциногении (что согласуется с данными K. Nigútová et al. (2005), V. Stropfová et al. (2008)), напрямую коррелирующая с наличием антилистериозной активности и активностью в отношении вирулентных изолятов вида *E. faecalis*. Выявленная закономерность находит подтверждение в работах W. Theppangna et al. (2007) и G.B. Özdemir et al. (2011), которые охарактеризовали спектр антимикробной активности наиболее часто встречающихся у штаммов *Enterococcus spp.* бактериоцинов А и Р. Названные энтероцины ингибируют рост *Listeria spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus spp.*, *Clostridium spp.* и выявляются практически в одинаковом проценте случаев.

На следующем этапе работы на основании комплексной оценки фенотипических и генетических характеристик энтерококков, выделенных из кишечника здоровых животных, мы отобрали из коллекции культур штамм *Enterococcus faecium* Ef790SAU, обладающий генетическими детерминантами бактериоциногении (*entP*, *entL50A*, *entL50B*), выраженным антагонистическим эффектом в отношении листерий и не имеющих факторов вирулентности, и попытались оценить, как модифицируется его биологическая активность в условиях макроорганизма на модели экспериментальной листериозной инфекции морских свинок. В ходе аналитической работы с полученными данными была установ-

лена способность штамма *E. faecium Ef79O-SAU* снижать летальность и микробную обсеменённость внутренних органов при экспериментальном листериозе морских свинок, причём энтерококки не столько препятствовали колонизации кишечника и проникновению листерий во внутренние органы, сколько способствовали более быстрой элиминации *L. monocytogenes* VMHA 004 из внутренних органов. Возможным объяснением эффективной элиминации возбудителя является индуцирование молочнокислыми бактериями экспрессии генов хемокинов макрофагами, что способствует привлечению в инфицированный

орган иммунокомпетентных клеток (моноцитов, НК-клеток, Th1-клеток) [16], [18]. Кроме того, показано, что энтерококки повышают концентрацию в сыворотке крови оксида азота (II) и воспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α), что также приводит к быстрой элиминации возбудителя из внутренних органов [13].

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования штамма *E. faecium Ef79OSAU* в качестве эффективного средства защиты от листериоза. На культуру *E. faecium Ef79OSAU* получен патент РФ на изобретение № 2571852.

18.09.2015

Список литературы:

1. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологии / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Гос. изд. мед. лит. – 1962. – 177 с.
2. Гармашева, И.Л. Идентификация и таксономия энтерококков / И.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко // Микробиол. журн. – 2010. – Т. 72. – № 5. – С. 49-58.
3. Ермоленко, Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы. Обзор литературы / Е.И. Ермоленко // Вестн.С.-Петербург. ун-та. – 2009. – Сер. 11. – Вып. 3. – С. 184-201.
4. Кудлай, Д.Г. Бактериоиногения / Д.Г. Кудлай, В.Г. Лиходед. – М.: Медицина, 1966. – 203 с.
5. Литвин, В.Ю. Факторы патогенности бактерий: функции в окружающей среде / В.Ю. Литвин, В.Н. Пушкарёва // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1994. – Приложение. – С. 83-87.
6. Похиленко, В.Д. Бактериоцины, их биологическая роль и тенденции применения / В.Д. Похиленко, В.В. Перельгин // Электронный научный журнал «Исследовано в России». – 2011. – С. 164-198. URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
8. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF / X. Qin, K.V. Singh, G.M. Weinstock [et al.] // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. – No. 11. – P. 3372-3382.
9. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces / D.M. Kagkli, M. Vancanneyt, P. Vandamme [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 103. – No. 5. – P. 1393-1405.
10. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources / C. Sabia, S. de Niederhausern, E. Guerrieri [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2008. – No. 104. – P. 970-979.
11. Development of Multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cyfA*, *esp*, and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* / V. Vankerckhoven, T. Van Autgaerden, C. Vael [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – No. 42. – P. 4473-4479.
12. Identification, characterization, and three-dimensional structure of the novel circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium* / K. Himeno, K.J. Rosengren, T. Inoue [et al.] // Biochemistry. – 2015. – Vol. 54. – No. 31. – P. 4863-4876.
13. Immunomodulatory properties of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and suppression of *Listeria monocytogenes* infection / H.J. Choi, M.S. Shin, S.M. Lee [et al.] // Microbiology and Immunology. – 2012. – Vol. 56. – No. 9. – P. 613-620.
14. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources / M.R. Foulquié Moreno, R. Callewaert, B. Devreese [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – No. 94. – P. 214-229.
15. Jackson, C.R. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci / C.R. Jackson, P.J. Fedorka-Cray, J.B. Barrett // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42. – No. 8. – P. 3558-3565.
16. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis / V. Veckman, M. Miettinen, S. Matikainen [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2003. – Vol. 74. – P. 395-402.
17. Molecular characterization and antibiotic resistance of *Enterococcus* species from gut microbiota of Chilean Altiplano camelids / K. Guerrero-Olmos, J. Báez, N. Valenzuela et al. // Infect. Ecol. Epidemiol. [electronic journal]. – 2014. – Vol. 4.
18. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection / L.M. dos Santos, M.M. Santos, H.P. de Souza Silva [et al.] // Med. Microbiol. Immunol. – 2011. – Vol. 200. – No. 1. – P. 29-38.
19. Nigútová, K. Bacteriocin-like activity production and resistance in selected enterococci and streptococci of animal origin / K. Nigútová, P. Pristas, P. Javorský // Archives Animal Nutrition. – 2005. – Vol. 59. – No. 3. – P. 205-211.
20. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin / V. Strompfová, A. Lauková, M. Simonová [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2008. – Vol. 132. – No. 3. – P. 293-301.
21. Özdemir, G.B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources / G.B. Özdemir, E. Oryaşın, H.H. Bıyık [et al.] // Indian Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 51. – No. 2. – P. 182-187.
22. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal / P. Poeta, D. Costa, N. Klibi [et al.] // J. Vet. Med. – 2006. – Vol. 53. – No. 5. – P. 203-208.

23. Popaganni, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications / M. Popaganni // *Biotechnol. Adv.* – 2003. – Vol. 21. – No. 6. – P. 465-499.
24. Resolution of phenotypically distinct strains of *Enterococcus* spp. in a complex microbial community using cpn60 universal target sequencing / C.J. Vermette, A.H. Russell, A.R. Desai [et al.] // *Microb. Ecol.* – 2010. – Vol. 59. – No. 1. – P. 14-24.
25. Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia / I. Jaouani, M.S. Abbassi, S.C. Ribeiro [et al.] // *J. Appl. Microbiol.* – 2015. – Vol. 119. – No. 4. – P. 1089-1100.
26. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins / W. Theppangna, T. Murase, N. Tokumaru [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2007. – Vol. 69. – No. 12. – P. 1235-1239.
27. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk / C. Reviriego, T. Eaton, R. Martín [et al.] // *Journal of Human Lactation.* – 2005. – No. 21. – P. 131-137.
28. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants / F. Biavasco, G. Foglia, C. Paoletti [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2007. – Vol. 73. – No. 10. – P. 3307-3319.
29. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? / T. Semedo, M.A. Santos, M.F. Lopes [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology.* – 2003. – No. 26. – P. 13-22.

Сведения об авторах:

Щепитова Наталья Евгеньевна, заведующая лабораторией молекулярно-генетических и бактериологических исследований кафедры микробиологии и заразных болезней факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Оренбургского государственного аграрного университета
460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, e-mail: nschepitova@mail.ru

Сычёва Мария Викторовна, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Оренбургского государственного аграрного университета, кандидат биологических наук, доцент,
460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, e-mail: sycheva_maria@mail.ru

Карташова Ольга Львовна, заведующая лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, доктор биологических наук, доцент
460795 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, e-mail: labpersist@mail.ru