

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ РОДА LACTOBACILLUS

Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Новикова Н.А., Иванова Т.П.,
Жирнов В.А.

ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия (603950, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71), e-mail: lab-lb@yandex.ru

В статье представлены данные по изучению таксономического положения и биологических свойств штаммов рода *Lactobacillus* из музея лактобацилл ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора. Штаммы идентифицированы с использованием MALDI TOF масс-спектрометра Autoflex (Bruker, Германия), изучен спектр биохимических свойств штаммов с помощью тест-систем API 50 CHL (bioMerieux, Франция), характер межбактериальных взаимодействий исследовали методом совместного культивирования на плотной питательной среде. В результате исследования подтвержден таксономический статус исследованных штаммов, с использованием программно-аппаратного комплекса BioTyper получены штаммоспецифичные масс-спектры, выявлены особенности сахаролитических свойств лактобацилл, а также способность к утилизации фосфоолигосахаридов. Установлены особенности межбактериальных взаимодействий лактобацилл и выделена группа штаммов, перспективных в отношении совместного культивирования.

Ключевые слова: лактобациллы, биологические свойства, антагонизм, межбактериальные взаимодействия.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLUS STRAINS

Tochilina A.G., Belova I.V., Soloveva I.V., Novikova N.A., Ivanova T.P.,
Zhirnov V.A.

Federal Budget Institution of Science «Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina» Of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russia (603950, Nizhny Novgorod, street Malaya Yamskaya, 71), e-mail: lab-lb@yandex.ru

The article represents new data on the study of taxonomic status and biological properties of *Lactobacillus* strains from the Museum of *Lactobacillus* of Federal Budgetary Institute of Rosпотребнадзор Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blokhina. The strains were identified using MALDI TOF Autoflex (Bruker, Germany) mass spectrometer; biochemical properties of the strains were studied using API 50 CHL (bioMerieux, France) test systems. Strains interactions were investigated by co-cultivation on solid medium. The study confirmed the taxonomic status of the examined strains. BioTyper hardware-software system was used to obtain strain-specific mass spectra and to identify features of *lactobacillus* saccharolytic properties as well as ability of phospho-oligosaccharides to utilization. The study determined features of *lactobacillus* interbacterial interaction and identified a group of stains characterized by a perspective for cocultivation.

Keywords: *Lactobacillus*, biological properties, antagonism, interbacterial interaction.

В настоящее время остается актуальным вопрос поиска новых штаммов бактерий рода *Lactobacillus* для создания современных пробиотических препаратов и продуктов функционального питания, что обусловлено широчайшим спектром полезных свойств этих микроорганизмов. Однако использование новых штаммов лактобацилл в биотехнологии для производства пробиотиков становится возможным лишь после детального изучения их биологических свойств и корректной идентификации, что регламентируется соответствующими нормативными документами - МУ 2.3.2.2789-10 и МУК 4.2.2602-10 [4; 5].

Ранее основой для видовой идентификации лактобацилл было изучение их

биохимических свойств, в частности способность ферментировать углеводы, что, если принять во внимание вариабельность этих свойств, нередко может приводить к неточности при идентификации, особенно при работе с близкородственными микроорганизмами. В современных методических документах рекомендуется использовать молекулярно-генетические методы, в частности секвенирование фрагментов гена 16S рРНК. Этот метод позволяет проводить точную видовую идентификацию, но не отражает штаммовые особенности микроорганизмов. Широкие возможности и перспективы для изучения штаммовых характеристик открывает метод MALDI TOF масс-спектрометрии, который позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и в ряде случаев получать уникальный набор рибосомальных белков (фингерпринт) для каждого из исследуемых штаммов.

Кроме точной видовой идентификации промышленно перспективных штаммов лактобацилл, обязательным является изучение их биологических свойств, в частности подробная характеристика их биохимического профиля и антагонистической активности.

Антагонистические свойства молочнокислых бактерий обусловлены продукцией органических кислот (молочной, уксусной), перекиси водорода и образованием субстанций, схожих с антибиотиками [9; 10]. Особую значимость изучение антагонистических свойств лактобацилл, а именно их межштаммовых взаимодействий приобретает в свете внедрения в технологические производственные циклы метода совместного культивирования, который является экономически выгодным и перспективным при создании пробиотиков и продуктов функционального питания на основе нескольких штаммов лактобацилл.

Этот вопрос неоднократно поднимался в отечественных и зарубежных исследованиях. Имеются данные об успешном совместном культивировании двух видов рода *Lactobacillus*. Установлено, что *L. salivarius* и *L. plantarum* имеют близкие физиологические показатели роста и совместное их выращивание дает соотношение клеток в стационарной фазе 60% к 40% [2]. Перспективными в отношении этого технологического подхода можно считать штаммы лактобацилл, которые обладают выраженным антагонизмом к патогенным и условно патогенным микроорганизмам и средним уровнем антагонизма к другим штаммам этого же рода [3].

Существует несколько подходов к изучению антагонизма микроорганизмов: *in vivo* при использовании гнотобиологической технологии, а также *in vitro*, методами отсроченного антагонизма и совместного культивирования [7]. Среди методов выявления антагонизма *in vitro* наибольшее распространение получил метод отсроченного антагонизма на плотной питательной среде, основанный на раздельном, последовательном культивировании испытуемых и индикаторных микроорганизмов. Недостатками метода являются: большой

расход питательных сред, длительность и трудоемкость исследования, отдельное последовательное культивирование испытуемого и индикаторного микроорганизмов, в результате чего можно определить только чувствительность индикаторной культуры к продуктам метаболизма испытуемого штамма, выращенного первым. Следовательно, метод отсроченного антагонизма позволяет обнаружить только продуцируемые экзаметаболиты, подавляющие развитие других бактерий, и не выявляет конкурентной борьбы, которая происходит при их совместном культивировании. В этом случае не в полной мере выявляются конкурентные взаимоотношения, которые могли бы проявиться при совместном выращивании. Нами был использован метод прямого совместного культивирования испытуемого и индикаторного штаммов на плотной питательной среде, предложенный Н.А. Глушановой [1], так как этот метод представляется наиболее информативным в нашем случае. Подобный метод и его модификация (на полужидкой питательной среде) рекомендован и в нормативных документах для определения способности пробиотических штаммов ингибировать представителей нормофлоры кишечника и выявления штаммов антагонистов при конструировании комплексных препаратов [4; 5].

Цель исследования: уточнить таксономическое положение отдельных штаммов рода *Lactobacillus*, изучить их биохимические свойства, установить тип их межштаммовых взаимоотношений и выделить группу штаммов, перспективных для совместного культивирования.

Материалы и методы исследования: в работе использовали 13 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных из кишечника здоровых людей и находящихся на хранении в Государственной коллекции лактобацилл ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора: *L. plantarum* 8 RA-3, *L. plantarum* 30, *L. plantarum* 1862, *L. fermentum* 39, *L. fermentum* 90 TC-4, *L. casei* 577, *L. casei* 583, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 6, *L. delbrueckii* 76, *L. acidophilus* 1660, *L. rhamnosus* 1790, *L. rhamnosus* 7, *L. rhamnosus* 526.

Для восстановления и рассева штаммов после вскрытия ампулы лиофильную массу заливали 1 мл среды MPC-1 (*Lactobacillus* MRS broth, HiMedia), переносили в стерильную пробирку и инкубировали при 37 °С 24 часа (I генерация штамма). На вторые сутки 0,5 мл I генерации пересевали на MPC-1 и инкубировали при 37 °С 24 часа (II генерация штамма).

Далее II генерацию штамма раститровывали на стерильном физиологическом растворе (рН 7,0), с разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} проводили высевы по 0,05 мл на плотную среду MPC-4 (*Lactobacillus* MRS agar, HiMedia) и инкубировали 48 часов при 37 °С в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, США.

Выросшие колонии микроорганизмов наносили на 3 ячейки-мишени для последующей масс-спектрометрии и остаток засеивали в МРС-1 для последующего изучения биохимического профиля.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного модифицированным твердотельным лазером. Все измерения проводили в линейном режиме, детектируя положительные ионы. Внешнюю калибровку проводили с помощью бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия), в качестве матрицы использовали α -циано-4-гидрокси-коричную кислоту (α -CHCA).

Пробоподготовка суточных культур исследуемых микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения по стандартному протоколу, представленному в руководстве пользователя, идентификация, запись, обработка и анализ масс-спектров проводилась с помощью программы BioTyper RTC. О достоверности идентификации судили по значению коэффициента совпадения (Score values) - 2,000 – 3,000 – идентификация до вида, 1,999-1,700 – идентификация до рода, 1,699 – 0 – идентификация не прошла) и значению категорий – А – достоверная идентификация до вида, В - достоверная идентификация до рода, С – недостоверный результат.

Для постановки ПЦР гена 16S рРНК геномную ДНК выделяли методом нуклеосорбции с использованием набора «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва), использовали стандартные реагенты производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора и специфические праймеры: FL 3' -gag ttt gat cct ggc tca gga- 5', RL 3' - cga cga cca tga acc acc tgt -5' [8]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол», Москва. ПЦР проводили на приборе «Терцик-МС2» («ДНК-технология», Москва).

Электрофорез продуктов амплификации выполняли в 1,5%-ном агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромида этидия, в течение 40 мин при 100 V на гель в трис-боратном буферном растворе. Очистку амплифицированного фрагмента от агарозного геля для последующего секвенирования проводили с помощью набора для очистки ДНК (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК выполняли с использованием секвенатора GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter). Полученные сиквенсы анализировали в программе BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и MEGA (www.megasoftware.com).

Расширенное изучение биохимических свойств штаммов было проведено с использованием стрипов API 50 CH_L (Biomerieux, Франция) согласно инструкции производителя.

Исследование биосовместимости лактобацилл проводили методом совместного культивирования на плотной питательной среде МРС-4. Суточную культуру, выращенную на жидкой питательной среде и стандартизированную по стандарту мутности, наносили на поверхность плотной питательной среды бактериологической петлей диаметром 3 мм. После впитывания капли, отступив 1-2 мм от ее края, на поверхность той же среды наносили в том же объеме каплю другой испытуемой культуры, которая, растекаясь, примерно наполовину покрывала первую каплю.

В наложенной части культуры развиваются при взаимном присутствии (совместное культивирование), конкурируя друг с другом. После подсыхания второй капли чашки с посевами переворачивали вверх дном и инкубировали при 37 °С с использованием газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, США. Каждый опыт ставили в двух повторах, меняя положения культур (с целью исключения влияния последовательности наслоения капель культур на характер роста в зоне совместного культивирования). Контролем служили капли одной и той же культуры, наслоенные друг на друга по описанной выше методике.

Учет результатов проводили через 24 и 48 часов после начала инкубации. При задержке роста одной из исследуемых культур взаимоотношения между ними рассматривались как антагонистические, а сами культуры относили в категорию бионесовместимых. Культуры считали биосовместимыми в случае обнаружения полного «слияния» пятен или усиления роста исследуемых штаммов в зоне совместного культивирования (мутуализм, синергизм, сателлизм). Если одна из культур в зоне совместного культивирования «выходит наверх», подавляя рост второй культуры, независимо от последовательности их нанесения, такой вариант расценивали как слабый антагонизм.

Наличие выраженной зоны угнетения (задержки роста) одной культуры по периферии пятна другой испытуемой культуры расценивали как признак сильного антагонизма (рис. 1). Опыт проводили в трехкратной повторности.

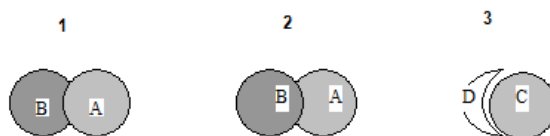


Рис. 1. Примеры проявления антагонизма испытуемых микроорганизмов при совместном культивировании на плотной среде: 1 – культура А проявляет антагонизм в отношении культуры В; 2 – культура В проявляет антагонизм в отношении культуры А; 3 – культура С проявляет резкий антагонизм в отношении культуры D

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе идентификации с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии получены индивидуальные масс-спектры для каждого исследуемого штамма лактобацилл, типичные масс-спектры представлены на рис. 2.

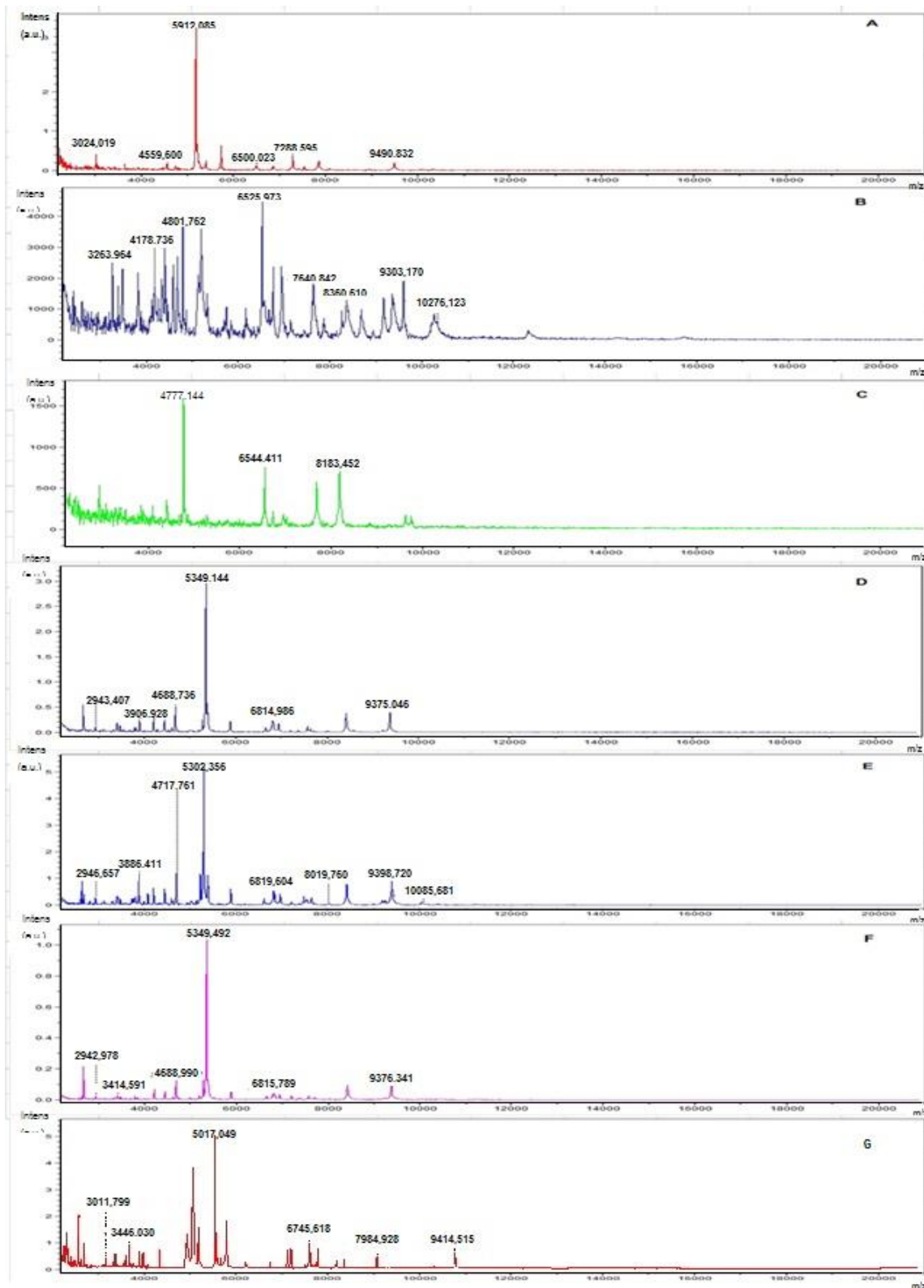


Рис. 2. Масс-спектры бактерий рода *Lactobacillus*, включенных в исследование, полученные с использованием α -CHCA -матрицы (A – *L. plantarum* 8 RA-3, B – *L. acidophilus* 1660, C – *L. delbrueckii* ssp. *lactis* 76, D – *L. casei* 577, E – *L. paracasei* ssp. *paracasei* 6, F – *L. rhamnosus* 7, G – *L. fermentum* 90 TC-4)

Хотя снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 2000-20000 m/z, визуально наиболее информативным является участок от 2000 до 10000 m/z. Все культуры были идентифицированы с использованием программно-аппаратного комплекса MALDI BioTyper, при этом значения Score values составили от 1,922 до 2,217 (категория А), что говорит о высокой степени достоверности полученных результатов. В ходе исследований подтвердилось таксономическое положение всех культур, кроме того, положение штамма *L. delbrueckii* 76 было уточнено и этот штамм идентифицирован как *L. delbrueckii* ssp. *lactis*. Таксономический статус исследованных штаммов также был подтвержден с использованием секвенирования фрагмента гена 16S рРНК: совпадение нуклеотидных последовательностей указанной детерминанты штаммов с наиболее близкими референсными последовательностями из GenBank составило 98-100%, результаты идентификации этим методом совпали с результатами MALDI масс-спектрометрии (рис. 3).

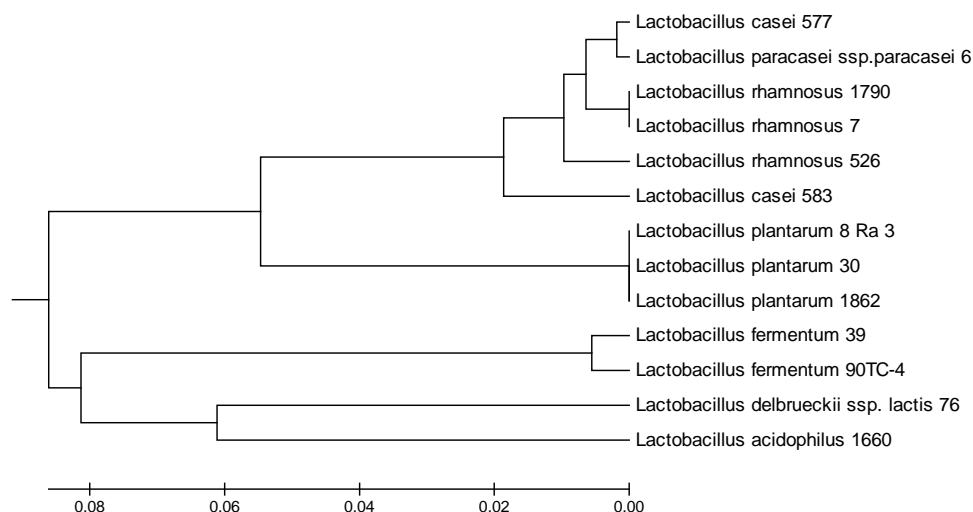


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основании анализа последовательности фрагмента гена 16S рРНК исследуемых штаммов лактобацилл с использованием алгоритма UPGMA

При изучении биохимических профилей с использованием тест-системы API 50CH₂ была проанализирована биохимическая активность штаммов с использованием набора из 49 субстратов.

Установлено, что штаммы видов *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei* и *L. rhamnosus* утилизируют наибольшее число субстратов, включая моносахара – гексозы (галактоза, фруктоза, манноза и др.), пентозы (арабиноза, рибоза), дисахариды (целлобиоза, мальтоза и др.), гликозиды (арбутин, амигдалин), глюкозиды (эскулин, салицин), сульфатированные олигосахариды (метил- α -D-маннопиранозид) и многоатомные спирты (сорбит, маннит).

Отличительной особенностью штаммов *L. plantarum* и *L. paracasei* является способность к утилизации мелецитозы, «отличительной меткой» штамма *L. fermentum* 39 - способность к гидролизу ацетилглюкозамина, арбутина и глюконата калия.

Штаммы *L. delbrueckii* ssp. *lactis* 76 и *L. acidophilus* 1660 утилизируют 12 субстратов, включая гексозы, N-ацетилглюкозамин, глюкозиды (салицин) и дисахариды. Штаммы вида *L. rhamnosus* утилизировали пентозы, гексозы, многоатомные спирты, сульфатированные олигосахариды (метил- α -D-маннопиранозид) и дисахариды.

Полученные данные также позволили подтвердить таксономический статус изученных штаммов. Необходимо отметить, что при анализе биохимической активности исследованные штаммы разделились по признаку утилизации сахаров. Это объясняется тем, что микроорганизмы относятся к двум разным биохимическим группам: виды *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* относятся к группе гомоферментативных лактобацилл, а виды *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* – к группе факультативно-гетероферментативных лактобацилл. Метаболизм сахаров у представителей этих групп принципиально отличается: в первом случае генетически детерминирован гликолитический путь, во втором – пентозофосфатный. Гомоферментативные лактобациллы неспособны сбраживать пентозы, а гетероферментативные микроорганизмы обладают двумя путями метаболизма сахаров, при этом сбраживание гексоз происходит по гликолитическому пути, а пентоз – по окислительному пентозофосфатному. При достаточном количестве гексоз их сбраживание идет по гликолитическому пути, а при снижении количества гексоз наличие в питательной среде пентоз индуцирует синтез фосфокетолазы.

По результатам изучения межштаммовых взаимоотношений исследуемые штаммы были разделены нами на три условные группы: штаммы с сильной антагонистической активностью, штаммы – слабые антагонисты и штаммы со средней антагонистической активностью.

К группе штаммов с сильной антагонистической активностью нами были отнесены штаммы *L. plantarum* 30, *L. delbrueckii* ssp. *lactis* 76 и *L. rhamnosus* 1790. Указанные микроорганизмы подавляют по семь (*L. plantarum* 30) и восемь штаммов (*L. delbrueckii* 76 и *L. rhamnosus* 1790). Высокий уровень антагонизма этих бактерий по отношению к представителям этого же рода ограничивает их применение при реализации принципа совместного культивирования как при периодическом, так и при непрерывном способе. Наиболее слабые антагонистические свойства проявил штамм *L. casei* 577. В ходе опыта развитие этого штамма подавлялось семью другими штаммами. Использование в составе комплексных заквасок данного штамма нецелесообразно, так как низкая устойчивость к

действию бактериоцинов родственных бактерий приведет к скорой гибели этого микроорганизма.

К группе со средней антагонистической активностью нами были отнесены следующие штаммы: *L. plantarum* 8 RA-3, *L. fermentum* 39, *L. fermentum* 90 TC-4, *L. casei* 583, *L. acidophilus* 1660. Все эти микроорганизмы биосовместимы с большим количеством штаммов и являются антагонистами небольшого количества штаммов (1-3 штамма).

Взаимоотношения бактерий этой группы относятся к синергидным, т.е. имеет место один из вариантов полезных межбактериальных взаимодействий: мутуализм, комменсализм или нейтрализм.

Лактобактерии, относящиеся к видам *L. fermentum* и *L. Delbrueckii*, ранее не привлекали внимание исследователей в направлении исследования способности к сосуществованию, биосовместимость этих микроорганизмов с другими видами с помощью методики совместного культивирования на плотной питательной среде была изучена нами впервые.

Данные о межштаммовых взаимоотношениях микроорганизмов, полученные нами, позволили выделить группу бактерий рода *Lactobacillus*, наиболее перспективных в отношении совместного культивирования. Наибольший интерес из изученной группы лактобактерий представляют штаммы *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39. Эти микроорганизмы обладают выраженным антагонизмом по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и устойчивостью к спектру антибактериальных средств, недетерминированной плазмидами [6]. Высокая степень биосовместимости этих штаммов, установленная нами впервые в описанном опыте, определила целесообразность их использования для совместного культивирования в составе мультиштаммовых пробиотиков.

Список литературы

1. Глушанова Н.А. Автореферат дис. ... д-ра мед. наук. - М., 2005. – 56 с.
2. Головач Т.Н. Опыт совместного культивирования лактобацилл // Микробиологический журн. – 2004. - № 6. – С. 23-25.
3. Лихачева А.Ю. Автореферат дис. ... канд. мед. наук. - Н. Новгород, 1992. – 199 с.
4. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: методические указания № 2.3.2.2789-10. – М. : Роспотребнадзор, 2010. –71 с.

5. Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические указания № 4.2.2602-10. – М. : Роспотребнадзор, 2011. – 80 с.
6. Соколова К.Я., Соловьева И.В. Дисбактериозы: теория и практика. - Н. Новгород, 1999. – 199 с.
7. Al-Madboly L.A., Abdullah A.K. Potent antagonistic activity of Egyptian *Lactobacillus plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens // *Front. Microbiol.* – 2015. - Vol. 6. – Art. 347.
8. Chagnaud P. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common *Lactobacillus* species // *J. of Microbiol Meth.* – 2001. - Vol. 44. – P. 139-148.
9. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis // *Peptides.* – 2004. - V. 25 (9). – P. 1405-1414.
10. Quadri L.E. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2002. - V. 82 (1-4). – P. 133-145.

Рецензенты:

Смирнов В.Ф., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии человека и животных ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород;

Заславская М.И., д.б.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Нижний Новгород.