

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФЕКАЛИЙ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И КАЗАХСТАНЕ

Червинец В.М.¹, Червинец Ю.В.¹, Беляева Е.А.¹, Лебедев С.Н.¹, Чаркова А.Р.¹, Трошин А.В.¹, Даниленко В.Н.², Урдобаев Ж.К.³, Жарасов М.Ж.³, Зевалкина Е.В.³

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тверь, e-mail: info@tvergma.ru;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, e-mail: iogen@vigg.ru;

³Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. Марата Оспанова, Актобе, e-mail: info@zkgmu.kz

Выделено 27 штаммов лактобацилл от здоровых коренных жителей Казахстана и 22 штамма лактобацилл от жителей ЦФО РФ. При изучении ферментативной активности штаммов лактобацилл, выделенных от жителей Западного Казахстана, в большей степени выявлены ферменты, утилизирующие нутриенты животного происхождения, инозитол, гликоген, глицерол, и в меньшей – растительного. Лактобациллы жителей ЦФО более активны в отношении растительных компонентов - метил-βD-глюкопиранозид, D-раффинозы, D-арабинозы. Лактобациллы жителей Казахстана обладали низкой и средней антагонистической активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и не действовали на дрожжевые грибы рода *Candida*; адгезивные свойства практически отсутствовали. Лактобациллы, выделенные от жителей ЦФО РФ, показали высокий антагонизм к грамположительным и грамотрицательным условно-патогенным и патогенным бактериям и грибам рода *Candida*; адгезивные свойства соответствовали средним показателям.

Ключевые слова: лактобациллы, здоровые люди, РФ, Казахстан.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM FECES OF HEALTHY PEOPLE LIVING IN THE RUSSIAN FEDERATION AND KAZAKHSTAN

Chervinets V.M.¹, Chervinets Yu.V.¹, Belyaeva E.A.¹, Lebedev S.N.¹, Charkova A.P.¹, Troshin A.V.¹, Danilenko V.N.², Urdobaev Z.K.³, Zharasov M.Z.³, Zevalkina E.V.³

¹Tver state medical university, Tver, e-mail: info@tvergma.ru;

²Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences named by N.I.Vavilov, Moscow, e-mail: 119991, iogen@vigg.ru;

³West Kazakhstan State Medical University named by Marat Ospanov, Aktobe, e-mail: info@zkgmu.kz

It was isolated 27 strains of lactobacilli from healthy indigenous people of Kazakhstan and 22 strains of lactobacilli from residents of the Central Federal District of the Russian Federation. The Lactobacillus strains isolated from residents of western Kazakhstan, increasingly produce enzymes that dispose of animal nutrients, inositol, glycogen, glycerol, and to a lesser - of vegetable. Lactobacilli isolated from population of the CFD more active against plant components - methyl-βD-glucopyranoside, D-raffinose, D-arabinose. Lactobacilli from residents of Kazakhstan have low and medium antagonistic activity against gram-negative and gram-positive pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms and are not acted on the yeast fungi of the genus *Candida*; adhesive properties were practically absent. Lactobacilli isolated from population of the Central Federal District of the Russian Federation, showed a high antagonism to the gram-positive and gram-negative opportunistic and pathogenic bacteria and fungi of the genus *Candida*; adhesive properties correspond to the average indicators.

Keywords: lactobacilli, healthy people, Russian Federation, Kazakhstan.

Известно, что фенотипические и генотипические признаки одного вида микроорганизмов, выделенных от различных людей в разных регионах, могут отличаться [1-4; 15].

Способность к адгезии кишечных лактобацилл изучают, используя клетки линий Caco-2 и HT29-MTX. G.J. Chauviere с соавторами [6] обнаружил, что не все штаммы лактобацилл адгезировались на энтероцитоподобных клетках Caco-2, указывая на штаммоспецифичность. Выявлено, что *L.acidophilus BG2FO4* и *LB*, *L. rhamnosus DR20*, *L. acidophilus HN017*, *L. casei Shirota*, *L. rhamnosus LC-705* прикрепляются к энтероцитоподобным клеткам Caco-2 [10].

Адгезия лактобацилл происходит за счет пассивных сил, электростатического и гидрофобного взаимодействия, а также специфических структур [7]. *L. johnsonii La1* проявляет высокую кальцийнезависимую адгезивность по отношению к культуре клеток Caco-2. Выделен поверхностный протеин *L. fermentum 104R* с молекулярной массой 29 kDa, который может вызывать адгезию, участвуя в прикреплении этого штамма к слизистой оболочке тонкого кишечника [12]. Установлено, что липотейхоевая кислота отвечает за адгезию *L. johnsonii La1*. *L. fermentum* имеет поверхностные лектиноподобные структуры белковой природы, благодаря которым штамм проявляет свои адгезивные свойства [8].

Установлено, что многие штаммы *L. casei* и *L. plantarum* имеют выраженный добавочный слой - гликокаликс, который можно рассматривать в качестве их адгезина. В то же время штаммы *L. fermentum* и *L. acidophilus* гликокаликса не имеют, или же он слабо выражен, и адгезия последних связана с другими структурами клеточной оболочки лактобацилл [8].

Таким образом, лактобациллы содержат большое количество разнообразных внешних структур, отвечающих за взаимодействие с эпителиальными клетками кишечника.

Недавние исследования показали, что несколько штаммов, идентифицированных с помощью API[®] 50 CHL как *L. plantarum*, оказались микроорганизмами вида *L. pentosus*, что было выявлено молекулярно-генетическими методами. В API[®] 50 CHL также отсутствуют профили базы данных видов *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* и *L. vaginalis*, что может привести к неверной идентификации [9; 14]. В то же время установлено, что результаты идентификации видов *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, полученные с использованием полимеразной цепной реакции, соответствуют результатам классического биохимического метода идентификации на основе сахаролитической активности различных видов лактобацилл [5].

Бактерии рода *Lactobacillus* обладают бродильным типом метаболизма, обладают способностью сбраживать лактозу при помощи р-галактозидазы. Образующиеся в ходе расщепления лактозы глюкоза и галактоза вступают на путь катаболизма гексоз по фруктозо-1,6-бисфосфатному пути (гликолиз) или по пентозофосфатному пути. Особенности катаболизма гексоз определяют подразделение представителей рода на две биохимические

группы: гомо- и гетероферментативные лактобациллы (которые наряду с молочной кислотой образуют значительное количество газа и ароматические вещества) [11]. Примеры гомоферментативных молочнокислых бактерий: *L. casei*, *L. acidophilis*. Примеры гомоферментативных молочнокислых бактерий: *L. fermentum*, *L. brevis*.

Получены данные, что 22% *L. plantarum*, выделенных из молочных продуктов Украины, не синтезировали биогенных аминов, и большинство штаммов лактобацилл не выделяло ацетон [13].

Цель работы: в сравнительном аспекте определить биохимическую активность, адгезивные и антагонистические свойства лактобацилл, выделенных от коренных жителей ЦФО РФ и Западного Казахстана.

Методика

Материалом для исследования послужили фекалии, выделенные от здоровых людей в возрасте 19-21 года, постоянно проживающих в Центральном федеральном округе РФ и Западном Казахстане. Лактобациллы выделяли из фекалий путем посева на среду МРС «HI Media» (Индия) и культивирования при 37 °С в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ 3-5%. Идентификация проводилась по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам с использованием API®50 CHL «Bio Mérieux Vitek, Inc.».

Первичное исследование антагонизма лактобацилл к тестовым культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводили согласно методике прямого антагонизма; после биохимической идентификации антагонистическую способность микроорганизмов выявляли методом отсроченного антагонизма по Л.П. Блинковой (2003). В качестве тест-культур были использованы следующие штаммы: *Candida albicans* ATCC 885-653, *Salmonella enterica* Typhimurium 415, *Shigella sonnei* I фазы 941 из коллекции культур НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН; *Bacillus subtilis* 534 из коллекции МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 из государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича. В качестве контроля использовался штамм *Lactobacillus plantarum* 8RA-3 из коллекции МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского с известным спектром антагонистической активности.

Адгезивную активность лактобацилл определяли, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) по методу В.И. Брилис (1986) на эритроцитах человека О (I) группы Rh+.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате выделено 27 штаммов лактобацилл от здоровых коренных жителей Казахстана и 22 штамма – от жителей ЦФО РФ.

При определении биохимических свойств лактобацилл выявлено, что 6 штаммов, выделенных от жителей ЦФО РФ, принадлежат к виду *L. fermentum*. Данный вид не выделялся из кишечника здоровых коренных жителей Казахстана. Метил-βD-глюкопиранозид ферментировали *L. fermentum* только в 33%.

К виду *L. plantarum* было отнесено 13 штаммов, выделенных от жителей Казахстана, и 15 - от жителей ЦФО РФ. D-тагатозу (15%), L-фукозу (8%), крахмал (8%), гликоген (8%), глицерол (15%) и D-арабит (46%) ферментировали только *L. plantarum*, выделенные у жителей Казахстана. Штаммы *L. plantarum*, выделенные от жителей ЦФО, ферментировали метил-βD-глюкопиранозид и L-сорбозу в 100% случаев. D-арабинозу ферментировали только штаммы (25%), выделенные от жителей ЦФО (рис. 1).

Вид *L. rhamnosus* был идентифицирован у 10 штаммов, выделенных от жителей Казахстана, и у 9 - от жителей ЦФО РФ. Глицерол (30%) и D-ликсозу (10%) ферментировали *L. rhamnosus*, выделенные только у жителей Казахстана. D-раффинозу ферментировали 25% штаммов, выделенных только от жителей ЦФО (рис. 2).

К виду *L. paracasei* отнесены 3 штамма, выделенные от жителей Казахстана, 2 - от жителей ЦФО РФ. В 67% случаев штаммы *L. paracasei*, выделенные только у жителей Казахстана, ферментировали инозитол.

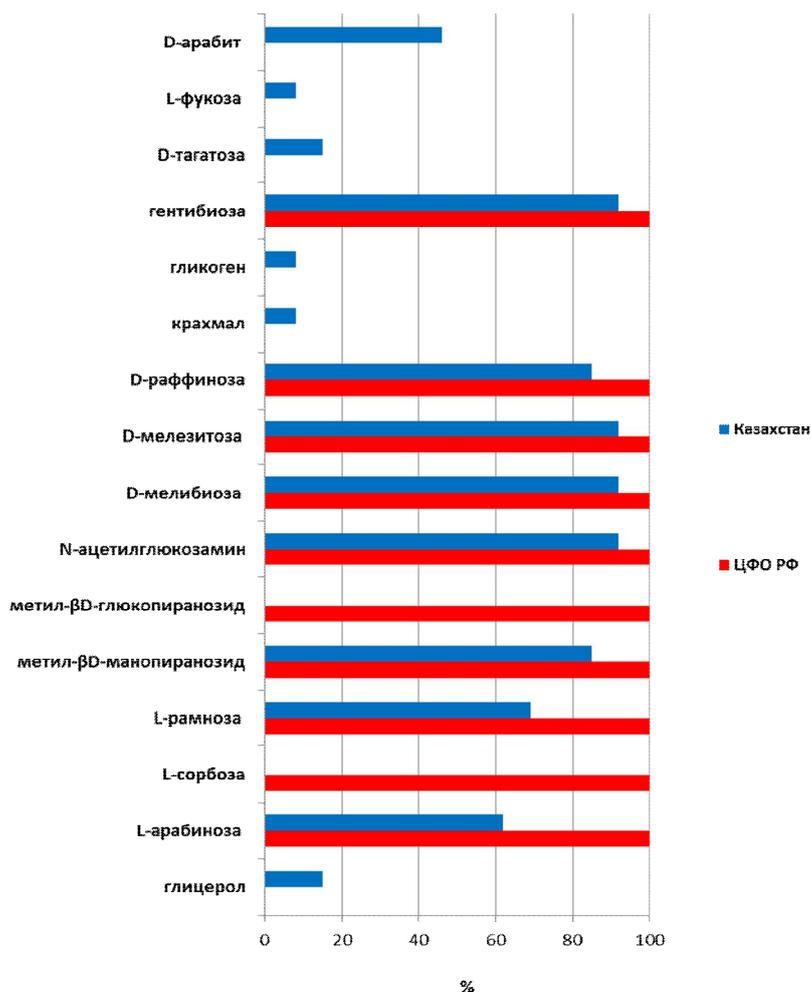


Рис. 1. Биохимическая активность *L. plantarum*, выделенных от жителей ЦФО РФ и Казахстана

Адгезия на культуре клеток. Значения среднего показателя адгезии (СПА) лактобацилл, выделенных от жителей Западного Казахстана – 0,95, что соответствует отсутствию адгезивных свойств. Лактобациллы у жителей ЦФО РФ (2,48) обладали среднеадгезивными свойствами.

Антагонистическая бактериальная активность лактобацилл, выделенных от жителей Казахстана, уступает таковой у жителей ЦФО РФ примерно в 2 и более раза в отношении грампозитивных и грамотрицательных микроорганизмов, а противогрибковая активность совершенно отсутствует по отношению к дрожжевым грибам рода *Candida* (таблица).

Ферментативная активность штаммов лактобацилл, выделенных от жителей Западного Казахстана, адаптирована к традиционной мясной пище. В большей степени выявлены ферменты, утилизирующие нутриенты животного происхождения, и в меньшей – растительного. Так, отмечена активность в отношении инозитола, раффинозы, гликогена, туранозы, метил-βD-глюкопиранозид.

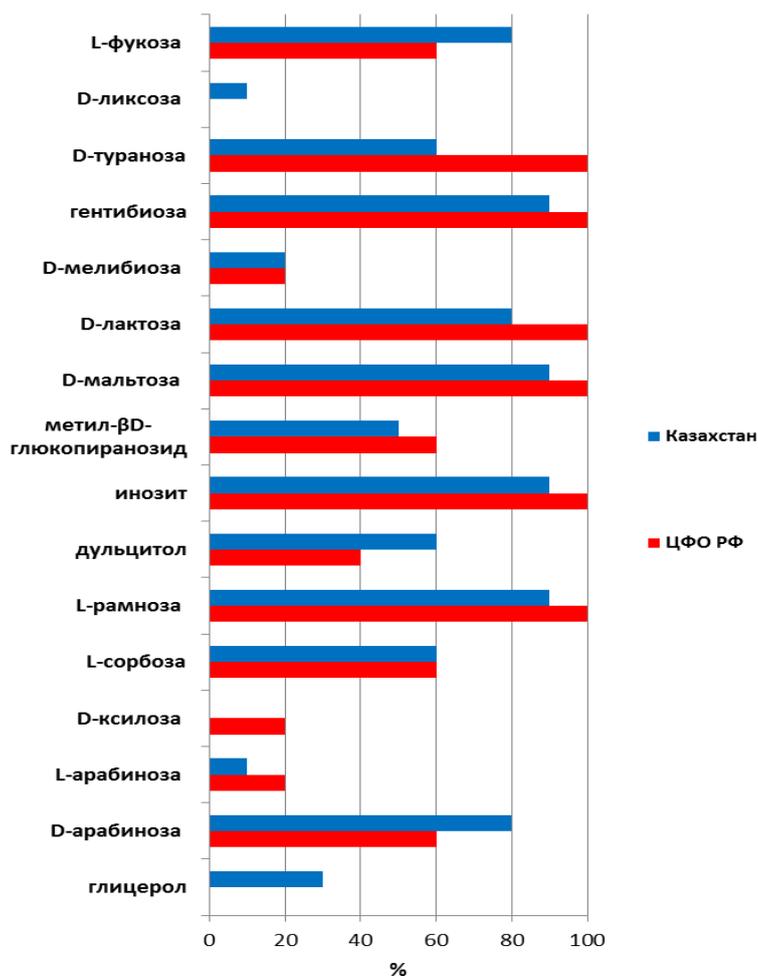


Рис. 2. Биохимическая активность *L. rhamnosus*, выделенных от жителей ЦФО РФ и Казахстана

Лактобациллы жителей ЦФО более активны в отношении растительных компонентов: метил-βD-глюкопиранозид, D-раффинозы, D-арабинозы.

Антагонистическая активность лактобацилл

№ п/п	Тест культуры микроорганизмов	Антагонистическая активность лактобацилл жителей Казахстана в мм (M±m)	Антагонистическая активность лактобацилл жителей ЦФО РФ в мм (M±m)
1.	<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	0±0	8,6±4,5
2.	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium 415	11,0±2,0	27,7,0±1,6
3.	<i>Shigella sonnei</i> I фазы 941	13,2±2,1	18,2±6,2
4.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11,5±2,3	27,2±0,8
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14,1±1,9	27,6±0,7
6.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,3±2,3	28,1±1,5
7.	<i>Bacillus subtilis</i> 534	16,3±2,5	25,2±0,6

Лактобациллы жителей Казахстана обладали низкой и средней антагонистической активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов и не действовали на дрожжевые грибы рода *Candida*, адгезивные свойства практически отсутствовали. Лактобациллы, выделенные от жителей ЦФО РФ, выгодно отличались своим высоким антагонизмом к грамположительным и грамотрицательным бактериям и грибам рода *Candida*. Адгезивные свойства соответствовали средним показателям.

Вывод. Лактобациллы, выделенные от жителей Западного Казахстана и ЦФО РФ, отличаются друг от друга ферментативной активностью, способностью к адгезии и активностью по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. У лактобацилл жителей ЦФО РФ более выражена протективная и персистирующая активность по сравнению с лактобациллами жителей Казахстана. Лактобациллы коренных жителей Западного Казахстана показали более выраженную ферментативную активность в расщеплении животных компонентов пищи, в то время как лактобациллы жителей ЦФО РФ были более активны в отношении растительных. Этот факт нужно учитывать при создании новых эффективных пробиотиков на основе лактобацилл.

Список литературы

1. Ботина С.Г., Глазова А.А., Коробан Н.В., Червинец В.М., Самоукина А.М., Гаврилова О.А., Лебедев Д.В., Миронов А.Ю., Червинец Ю.В. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биопленок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 2. - С. 44-46.
2. Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Классификация отечественных культур рода *Lactobacillus* // Журн. микробиол. - 2010. - № 5. - С. 5-7.
3. Ботина С.Г., Коробан Н.В., Климина К.М., Глазова А.А. Генетическое разнообразие бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиомы людей // Генетика. - 2010. - Т. 46. - № 12. - С. 1589-1597.
4. Червинец В.М., Миронов А.Ю., Ботина С.Г., Гагарина Е.Ю., Самоукина А.М., Михайлова Е.С., Червинец Ю.В. Индигенные лактобациллы полости рта человека – кандидаты в пробиотические штаммы // Человек и здоровье : Курский научно-практический вестник. - 2012. - № 1. - С. 131-137.
5. Bhardwaj A., Puniya M., Sangu K.P.S., Kumar S., Dhewa T. Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* species Isolated from Dahi // A Journal of Dairy Science and Technology. - 2012. - V. 2. - P. 1-14.

6. Chauviere G.J., Coconnier M., Kernéis S., Fourniat J., Servin A.L. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells // *Gen. Microbiol.* - 1992. - № 138. - P. 1689-1696.
7. Ferreira C.L., Grześkowiak L., Collado M.C., Salminen S. In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens // *J Food Prot.* - 2011. - № 74 (9). - P. 1482-1487.
8. Gusils C., Bujazha M., González S. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed // *Interciencia.* - 2002. - № 27. - P. 409-413.
9. Marroki A., Zúñiga M., Kihal M., Pérez-Martínez G. Characterization of *Lactobacillus* from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological properties // *Brazilian Journal of Microbiology.* - 2011. - № 42. - P. 158-171.
10. Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Tölkö S., Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus // *Int. J. Food Microbiol.* - 2001. - № 64. - P. 119-126.
11. Prückler M., Lorenz C., Endo A., Kraler M., Dürschmid K., Hendriks K., Soares da Silva F., Auterith E., Kneifel W., Michlmayr Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread // *Food Microbiol.* - 2015. - № 49. - P. 211-219.
12. Rojas M., Ascencio F.P., Conway L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin // *J. Appl. Environ. microbiol.* - 2002. - № 68. - P. 2330-2336.
13. Vasyliuk O.M., Kovalenko N.K., Harmasheva I.L. Physiological and biochemical properties of the *Lactobacillus plantarum* strains, isolated from traditional fermented products of Ukraine // *Mikrobiol Z.* - 2014. - № 76. - P. 2-8.
14. Wall R., Fitzgerald G., Hussey S., Ryan T., Murphy B., Ross P., Stanton C. Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2007. - № 59. - P. 127-137.
15. Yatsunencko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Gloria M. Human gut microbiome viewed across age and geography // *Nature.* - 2012. - № 486 (7402). - P. 222-227.