

На правах рукописи

**ТОЧИЛИНА АННА ГЕОРГИЕВНА**

**БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS**

**03.00.04 – биохимия**

**03.00.07 – микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук**

**Нижний Новгород – 2009**

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор Н. А. Новикова

доктор медицинских наук К.Я. Соколова

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор А.П. Веселов

кандидат биологических наук И.С. Горлова

**Ведущая организация:**

Нижегородская государственная медицинская академия

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 при Нижегородском госуниверситете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2009 года

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

А.С. Корягин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Микроорганизмы рода *Lactobacillus* широко распространены в природе, а некоторые виды являются важнейшими представителями микробиоты организма человека [Бондаренко В.М. и др, 2003]. Лактобациллы длительное время привлекают внимание ученых – биохимиков, микробиологов, медиков, экологов, ввиду их потенциального значения для поддержания гомеостаза системы «человек-окружающая среда», сохранения здоровья населения, профилактики и лечения многих заболеваний различной этиологии.

В настоящее время известно, что главным конечным продуктом метаболизма лактобацилл является D- и L-молочная кислота. У гомоферментативных лактобацилл лактат составляет 90% всех продуктов брожения. У представителей гетероферментативных видов в качестве конечных продуктов также образуется молочная кислота и углекислый газ [Шлегель Г., 1987]. Благодаря продукции органических кислот, перекисей и бактериоцинов многие штаммы лактобацилл проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении патогенных и оппортунистических микроорганизмов [Quadri L.E., 2002; Kleerebezem, 2004]. Бактерии рода *Lactobacillus* усиливают гидролиз белков, сбраживают углеводы, омыляют жиры, препятствуют микробному декарбоксилированию пищевого гистидина и повышению количества гистамина [Воробьёв А.А. и др, 1999]. В то же время актуальным является получение новых знаний о молекулярно-генетической структуре и биологических свойствах лактобацилл.

Биохимические и морфологические свойства лактобацилл являются в настоящее время основным и единственным критерием межродовой и видовой идентификации этих микроорганизмов. Альтернативой классической биохимической идентификации может стать метод генотипирования с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Разработка новых и

оптимизация известных молекулярно-генетических методик индикации и точной видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* является актуальной, практически значимой и своевременной задачей, которой уделяется большое внимание как отечественными, так и зарубежными исследователями. Однако, несмотря на углубленное изучение этого вопроса на настоящий момент еще отсутствует оптимальная унифицированная лабораторная методика на основе ПЦР, позволяющая проводить индикацию и идентификацию видов рода *Lactobacillus*. Наряду с индикацией и идентификацией лактобацилл чрезвычайно важной остается проблема их использования в ряде отраслей микробиологической промышленности (пищевой, фармацевтической). В настоящее время ведется поиск новых биотехнологических подходов к культивированию продуцентов, превосходящих по эффективности раздельное, например совместное культивирование ряда видов микроорганизмов-продуцентов в случае, когда целевым продуктом является многокомпонентный препарат. Необходимым условием успешной реализации этого технологического подхода является наличие симбиотических отношений бактерий-продуцентов. При осуществлении принципа совместного культивирования наиболее пристального внимания заслуживает вопрос контроля динамики роста и количества всех штаммов на разных стадиях процесса. В этой ситуации применение унифицированных молекулярно-генетических методик на основе ПЦР позволит избежать трудоемкого и длительного процесса идентификации бактерий классическим методом.

### **Цель исследования**

На основе изучения биохимических свойств и структуры генома разработать унифицированный метод на основе ПЦР для индикации и видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* и исследовать их межштаммовые взаимоотношения.

### **Задачи**

1. Изучить биохимические свойства новых штаммов лактобацилл (сахаролитические свойства).
2. На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения, представленных в GenBank, подобрать композицию универсальных праймеров для индикации бактерий рода *Lactobacillus*.
3. Провести оценку сравнительной эффективности различных методов выделения ДНК из клеток бактерий рода *Lactobacillus* – ферментативного лизиса, кипячения и нуклеосорбции, для последующего проведения ПЦР.
4. Установить нуклеотидную последовательность фрагмента гена 16S рРНК следующих штаммов пробиотических лактобацилл: *L. plantarum* 8 RA-3, *L. fermentum* 39 и *L. casei* 583.
5. Разработать схему видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* с использованием «гнездовой» ПЦР специфического фрагмента индикации.
6. Провести сравнение метода видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* с использованием ПЦР и классического биохимического метода.
7. На основе изучения биологических (межштаммовых взаимодействий) и популяционно-ростовых свойств микроорганизмов рода *Lactobacillus* определить композицию биосовместимых штаммов для осуществления процесса совместного культивирования при создании нового многокомпонентного пробиотика и отработать методологию контроля динамики роста с использованием ПЦР.

### **Научная новизна**

Разработана новая методика ПЦР для индикации бактерий рода *Lactobacillus*, основанная на оригинальных (авторских) родоспецифичных праймерах FLg, RLgI и RLgII, составивших предмет патентования.

Впервые установлены нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК штаммов *L. plantarum* 8 RA-3, *L. casei* 583, *L. fermentum* 39, которые депонированы в GenBank под номерами FJ210723, FJ210724, FJ210725, что расширило международную базу нуклеотидных последовательностей генома лактобацилл.

Создана унифицированная схема видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* с использованием гнездового варианта ПЦР, включающая авторский праймер для идентификации *L. delbrueckii*.

При изучении межштаммовых взаимоотношений 10 штаммов лактобацилл впервые установлена биосовместимость бактерий *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39. Эффективность совместного выращивания, установленная нами, обосновала создание симбиотика на основе этих лактобацилл с использованием принципа совместного культивирования (Патент №2280465, приоритет от 25.10.2004).

С помощью разработанной методики определены параметры контроля динамики роста новой композиции биосовместимых штаммов вида *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 при совместном культивировании.

### **Практическая значимость работы**

Полученные результаты позволили обосновать новые области применения ПЦР при подборе штаммов-продуцентов на этапе идентификации и для контроля штаммового состава на всех этапах производства пробиотических препаратов. Разработанная методология родовой и видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* позволит усовершенствовать контроль технологического процесса на предприятиях по производству фармакопейных препаратов, БАД к пище и продуктов питания на основе молочнокислых микроорганизмов и поставить на новый методический уровень контроль мультиштаммовых пробиотических продуктов на соответствие НТД в органах Роспотребнадзора и Центрах сертификации.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанные методики на основе специфической амплификации фрагмента гена 16S рРНК позволяют проводить индикацию и видовую идентификацию пробиотических штаммов лактобацилл, сопоставимую с их классической биохимической идентификацией.
2. Штаммы *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39, относящиеся к двум разным подгруппам гетероферментативных лактобацилл, обладают синергидными взаимоотношениями, что обосновало их использование в качестве штаммов-продуцентов пробиотиков в условиях технологии совместного культивирования.
3. Разработанный метод полимеразной цепной реакции с использованием «контрольных разведений» бактериальных культур является адекватным для оценки динамики роста *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 в условиях совместного культивирования.

### **Апробация работы**

Основные положения и результаты работы были доложены на конкурсе молодых ученых, проводимом в рамках IV съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (г. Пущино, 2007 г.), на заседаниях Ученого Совета и проблемных научно-практических семинарах Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (2005-2008 гг.).

### **Структура и объем диссертации**

Материалы диссертации изложены на 148 страницах машинописного текста, иллюстрированы 17 рисунками и 15 таблицами. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 185 источников, из которых 108 иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

В исследовании использовали:

- 16 штаммов рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Streptococcus* в том числе *L.plantarum* 8RA-3, *L.plantarum* 38, *L.fermentum* 39, *L.fermentum* 90-ТС-4, *B.bifidum* 1, *B.bifidum* 791, разрешенные ГИСК им. Л.А. Тарасевича в качестве производственных;
- коммерческие лиофильно высушенные препараты: «Линекс» (фирма «Lek»), «Бифидумбактерин» и «Бификол» (фирма «Микроген») и коммерческие кисломолочные продукты: «Активия» и «Актимель» (фирма Danon); «Иммунеле» (фирма Вимм-Билль-Данн);
- нуклеотидные последовательности гена 16S рибосомной РНК бактерий рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, собранные в базе данных GenBank/EMBL/DDBJ. Всего проанализировано 43 последовательности;
- компьютерные программы BLAST([www.ncbi.nlm.nih.gov\ BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), Oligo 4.0, Mega v.3.0, Mega v.4.0 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net));
- питательные среды для культивирования и дифференциации молочнокислых бактерий. Для выращивания культур бактерий рода *Lactobacillus* использовали модифицированные питательные среды МРС (среда J. C. De Man, M. Rogosa и E. Sharpe): полужидкую, содержащую 0,15% агара (МРС-2) и плотную, содержащую 2% агара (МРС-4).

Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* проводили по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов»: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы. Определение ферментации углеводов проводили с использованием дисков с углеводами и бульона с бромкрезоловым пурпурным производства «HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия.



Для выделения ДНК использовали 12-ти часовую культуру, предварительно стандартизованную согласно стандарту мутности, равному 10 единицам. Выделение ДНК проводили с использованием метода кипячения, метода с использованием лизоцима и метода нуклеосорбции [Boom R. et al, 1990; Yost C.K. et al, 2000; Torriani S. et al, 2001].

В работе использовали праймеры, сконструированные в настоящей работе, а также предложенные в научной литературе [Ward L.J. et al, 1999; Walter J. et al., 2000; Chagnaud P., 2001].

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 31100 и набора реагентов ABI Prism Big Dye Terminator v. 3.1., согласно рекомендациям производителя в совместной работе с к.б.н. Голицыной Л.Н. и к.б.н. Парфеновой О.В. Нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК использовали для идентификации штаммов лактобацилл в программе BLAST [[www.ncbi.nlm.nih.gov\BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)].

Исследование биосовместимости лактобацилл проводили методом совместного культивирования на плотной питательной среде МРС. Были исследованы 10 штаммов лактобацилл.

Особенности динамики развития микробной популяции *L.plantarum* 8RA-3 и *L.fermentum* 39 при условиях совместного и отдельного культивирования изучали методом серийных разведений на жидкой среде МДС, путем посева на плотную среду МДС-м и постановки ПЦР в контрольных точках культивирования (3, 6, 9, 12, 24, и 27 часов). Длительность фаз роста культуры определяли графически. Показатели роста культур – удельную скорость роста по количеству жизнеспособных клеток рассчитывали с помощью критерия Иерусалимского [Гланц С., 1999].

Статистическую обработку данных осуществляли общепринятым методом с использованием коэффициента Стьюдента [Гланц С., 1999].

## Результаты и их обсуждение

### **1. Изучение биохимических свойств вновь выделенных штаммов рода *Lactobacillus***

Изучение биохимических свойств лактобацилл, в частности способности ферментировать углеводы, является основой для видовой идентификации этих бактерий. В этом разделе работы представлены данные об изучении биохимических свойств 10 штаммов 7 видов бактерий рода *Lactobacillus* (148 культур), выделенных в лаборатории микробиоценозов и конструирования пробиотиков из фекалий здоровых детей первого года жизни: *L. casei* 577, *L. plantarum* 30, *L. delbrueckii* 76, *L. rhamnosus* 1790, *L. acidophilus* 1660, *L. casei* 583, *L. plantarum* 1862, *L. paracasei* spp. *paracasei* 6, *L. rhamnosus* 7, *L. rhamnosus* 526. Необходимо отметить, что первичное установление способности ферментировать сахара, многоатомные спирты и гидролизовать глюкозиды и видовой идентификация этих микроорганизмов была проведена в 1990 году при их выделении с использованием доступных и актуальных на тот момент тест-систем и питательных основ. Нашей задачей является расширенное изучение биохимических свойств этих штаммов с использованием коммерческих стандартизированных тест-систем фирмы «HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия.

Изученные микроорганизмы относятся к двум разным биохимическим группам: виды *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* относятся к группе гомоферментативных лактобацилл, а виды *L. casei*, *L. plantarum*, *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, что подтверждено нашими исследованиями (табл. 1).

В результате работы нами был изучен спектр утилизируемых субстратов: углеводов, в том числе олигосахарид раффиноза, метаболизм которого вновь

выделенными штаммами не был изучен ранее, многоатомных спиртов (сорбит, маннит) и глюкозидов (салицин, эскулин). Из таблицы 1 видно, что наибольшее количество субстратов утилизируют лактобациллы, принадлежащие к группе факультативно-гетероферментативных лактобацилл. Это связано с тем, что гомоферментативные лактобациллы неспособны сбраживать пентозы, а гетероферментативные микроорганизмы обладают двумя путями метаболизма сахаров, при этом сбраживание гексоз происходит по гликолитическому пути, а пентоз – по пентозофосфатному.

Таблица 1

## Биохимические свойства вновь выделенных штаммов лактобацилл

| Виды  | Номер штамма     | Целлобиоза | Галактоза | Лактоза | Мальтоза | Маннит | Манноза | Мелибиоза | Раффиноза | Салицин | Сахароза | Трегалоза | Арабиноза | Сорбит | Ксилоза | Эскулин | Меллицитоз |
|---|------------------|------------|-----------|---------|----------|--------|---------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|-----------|--------|---------|---------|------------|
| Гомоферментативные лактобациллы                 |                  |            |           |         |          |        |         |           |           |         |          |           |           |        |         |         |            |
| <i>L. acidophilus</i>                           | АЩГ <sub>3</sub> | +          | +         | +       | +        | -      | +       | -         | +         | +       | +        | +         | -         | -      | -       | +       | -          |
| <i>L. acidophilus</i>                           | 1660             | +          | +         | +       | +        | -      | +       | -         | +         | +       | +        | -         | -         | -      | -       | +       | -          |
| <i>L. delbrueckii</i><br><i>ssp. bulgaricus</i> | 76               | +          | -         | +       | -        | -      | -       | -         | -         | -       | -        | -         | -         | -      | -       | -       | -          |
| Факультативно-гетероферментативные лактобациллы |                  |            |           |         |          |        |         |           |           |         |          |           |           |        |         |         |            |
| <i>L. casei</i>                                 | 583              | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. casei</i>                                 | 577              | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. paracasei</i><br><i>ssp. paracasei</i>    | 6                | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. plantarum</i>                             | 30               | +          | +         | +       | +        | +      | +       | +         | +         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. plantarum</i>                             | 1862             | +          | +         | +       | +        | +      | +       | +         | +         | +       | +        | +         | +         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. rhamnosus</i>                             | 1790             | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. rhamnosus</i>                             | 526              | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |
| <i>L. rhamnosus</i>                             | 7                | +          | +         | +       | +        | +      | +       | -         | -         | +       | +        | +         | -         | +      | -       | +       | +          |

Практический и научный интерес представляет изучение способности лактобацилл к утилизации раффинозы. Этот углевод относится к группе фосфоолигосахаридов (ФОС), используется в составе пробиотических препаратов в качестве пребиотического компонента. Способность к утилизации этого олигосахарида зависит от наличия или отсутствия специфических гликозил-гидролаз. Раффинозу утилизировали штаммы, относящиеся к виду *L. plantarum* и *L. acidophilus*, у видов *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* утилизации этого олигосахарида не наблюдалось.

При проведении видовой идентификации по спектру изученных свойств возникли трудности при дифференциации видов *L. casei*, *L. paracasei* spp. *paracasei* и *L. rhamnosus*, так как их биохимические свойства сходны, отличием является лишь способность к росту при 15°C и 45°C. Подобные сложности при использовании биохимического метода обуславливают актуальность разработки альтернативных методов идентификации на основе молекулярно-генетических характеристик.

## **2. Разработка методики индикации бактерий рода *Lactobacillus* на основе специфической амплификации нуклеиновых кислот**

Индикация и идентификация молочнокислых бактерий классическими биохимическими методами затруднена, так как предусматривает выделение чистой культуры и, соответственно, занимает достаточно длительный отрезок времени (до 8 суток), в связи с чем неудобна для практических лабораторий и, тем более, не удовлетворяет требованиям текущего оперативного контроля продуктов питания. В связи с вышеизложенным очевидно, что разработка унифицированной схемы индикации и идентификации бактерий молочнокислого брожения, в частности широко применяемых в микробиологической промышленности микроорганизмов рода *Lactobacillus*, представляется актуальной задачей, имеющей большое научно-практическое значение.

На первом этапе работы с использованием программы Mega v.3.0 и Mega v.4.0 нами был проведен сравнительный анализ 43 выровненных полных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения. Пример анализа показан в таблице 2.

По результатам анализа сконструированы новые универсальные праймеры для индикации бактерий рода *Lactobacillus* также на основе гена 16S рРНК: FLg, RLg I, RLg II.

Пара праймеров FLg - RLg I фланкирует фрагмент гена 16S рРНК, расположенный с 48 по 785 нуклеотид, размер получаемого фрагмента – 737 п.н. Размер фрагмента, получаемого при работе с парой праймеров FLg - RLg II составляет 612 п.н. Эта пара праймеров фланкирует фрагмент гена 16S рРНК, расположенный с 48 по 660 нуклеотид. Позиции указаны по последовательности гена 16S рРНК *L. casei* BCRC10697.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения в регионе прямого родового праймера FLg

| Источник                     | Нуклеотидные последовательности |     |     |     |     |     |
|------------------------------|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                              | (5' → 3')                       |     |     |     |     |     |
| FLg                          | atg                             | caa | gtc | gag | cga | gyt |
| <i>L. delbrueckii</i> JSQ2   | ---                             | --- | --- | --- | --- | --- |
| <i>Bifidobacterium</i> sp.   | ---                             | --- | --- | --a | --g | tga |
| <i>Leuconostoc</i> sp.       | ---                             | --- | --- | --a | --c | -ca |
| <i>Lactococcus</i> sp.       | t-a                             | gg- | ag- | -cc | -tc | c-- |
| <i>Streptococcus</i> sp.     | ---                             | --- | --a | --a | --c | tga |
| <i>Carnobacterium</i> sp.    | ---                             | --- | --- | --a | --c | t-- |
| <i>Propionibacterium</i> sp. | c--                             | --- | agt | cg- | aac | cgg |

Теоретическая специфичность праймеров была подтверждена экспериментально на 12 штаммах бактерий, из них 9 штаммов рода

*Lactobacillus*, 2 штамма рода *Bifidobacterium* и 1 штамм рода *Streptococcus*.  
(рис.1)

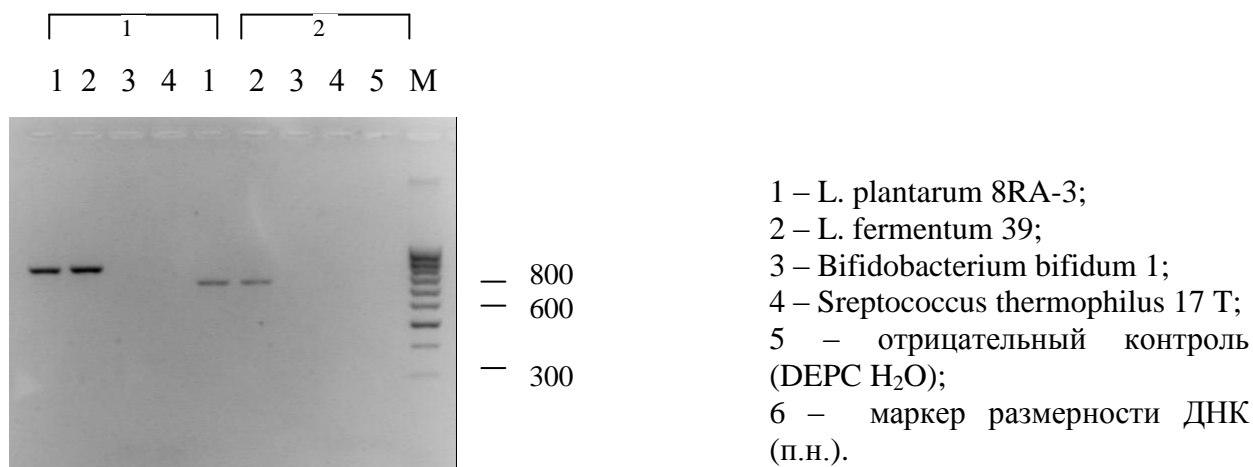


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК гена 16S рРНК бактерий молочнокислого брожения с использованием пары праймеров FLg - RLg I (1) и FLg – RLg II(2)

Представленные олигонуклеотиды могут составлять основу для разработки тест-систем, позволяющих проводить индикацию бактерий рода *Lactobacillus* в однораундовой и двухраундовой полугнездовой ПЦР.

Конструирование универсальных праймеров для амплификации фрагмента 16S рРНК лактобацилл позволило наработать фрагмент, размер которого достаточен для получения геномных характеристик, отсутствующих у штаммов, которые использовались в нашей работе. Было проведено секвенирование фрагмента гена 16S рРНК бактерий *L. plantarum* 8 RA-3, *L. casei* 583 и *L. fermentum* 39, полученного при использовании пары праймеров FLg - RLg II. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК штаммов *L. plantarum* 8 RA-3, *L. casei* 583, *L. fermentum* 39, депонированы в GenBank под номерами FJ210723, FJ210724, FJ210725.

В работе были апробированы 3 метода выделения геномной ДНК: метод кипячения, многоэтапный метод с применением ферментативной обработки и метод нуклеосорбции. Для выделения ДНК использовали 12-ти часовую культуру. Культуры предварительно стандартизировали согласно стандарту

мутности, равному 10 единицам. Данное значение оптической плотности бактериальной взвеси соответствует  $10^9$  микробных клеток в миллилитре раствора. Порог аналитической чувствительности ПЦР при использовании метода кипячения составил 10000 ГЭ/мл, при использовании метода ферментативной обработки - 100-1000 ГЭ/мл пробы, при использовании метода нуклеосорбции - 10-100 ГЭ/мл пробы. Этот метод был апробирован на различных промышленных препаратах и продуктах функционального питания, содержащих лактобациллы. (рис.2).

Представленные результаты свидетельствуют о высокой эффективности метода нуклеосорбции для выделения ДНК лактобацилл из различных субстратов и дальнейшей постановки ПЦР.

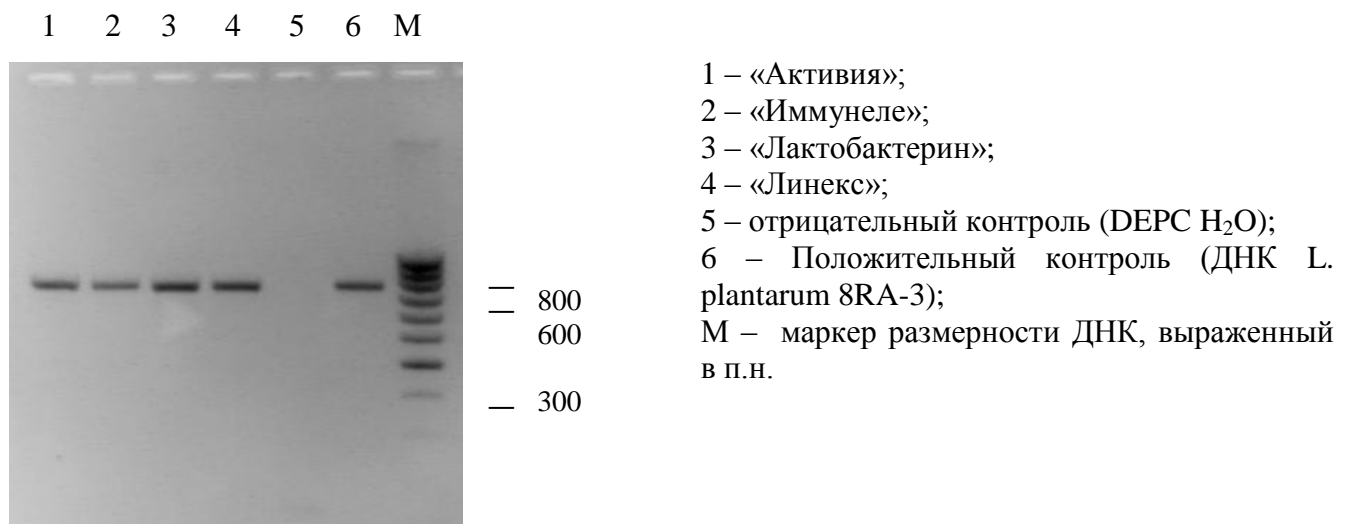


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента ДНК генома представителей рода *Lactobacillus*, содержащихся в различных субстратах

### 3. Разработка унифицированной схемы видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* на основе ПЦР гена 16S рРНК и ее апробация

Для создания унифицированной схемы видовой идентификации лактобацилл нами был использован принцип гнездовой ПЦР на основе фрагмента 737 п.н., получаемого в результате амплификации ДНК с использованием праймеров FLg и RLg I.

На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ представленных в научной литературе праймеров для идентификации *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. casei* и *L. rhamnosus*. Праймеры были проверены на специфичность и наличие нуклеотидных замен путем анализа 43 выровненных нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК различных видов бактерий молочнокислого брожения и анализа сиквенсов фрагментов гена 16S рРНК штаммов *L. plantarum* 8 RA-3, *L. fermentum* 39 и *L. casei* 583, установленных в рамках проведенной работы. Олигонуклеотиды FERM 1, PLANT1 и CASE3 были модифицированы с учетом выявленных нуклеотидных замен. Для идентификации *L. delbrueckii* был сконструирован новый праймер, находящийся в области последовательности, фланкированной FLg – RLg I (RLg II). Вновь разработанный праймер FLd обладает низкой степенью гомологии относительно соответствующих регионов ДНК других бактерий молочнокислого брожения, что обеспечивает его специфичность.

Все олигонуклеотиды являются прямыми, составляют систему с праймерами RLg I и RLg II и позволяют в монопостановке или, в ряде случаев, в мультиплексной постановке, проводить идентификацию 6 видов промышленно-значимых лактобацилл (рис. 3).

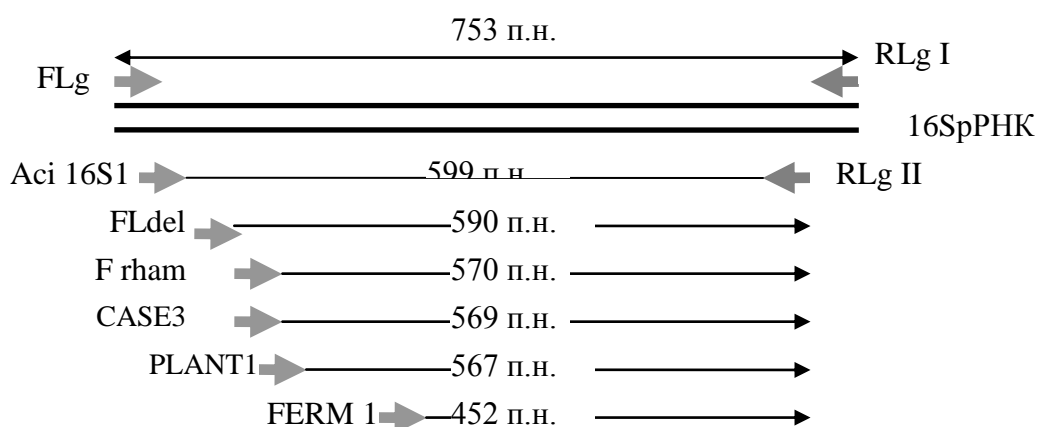


Рис.3. Унифицированная комплексная схема видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* методом гнездовой ПЦР.



Теоретическая специфичность праймеров была подтверждена экспериментально на 12 штаммах бактерий, из них 9 штаммов рода *Lactobacillus*, 2 штамма рода *Bifidobacterium*, 1 штамм рода *Streptococcus* и *Escherichia*. Оптимизированные и вновь разработанные праймеры легли в основу унифицированной комплексной схемы идентификации бактерий *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* с использованием гнездовой ПЦР. Разработанная схема позволяет существенно повысить специфичность и чувствительность анализа, использование единого обратного праймера **RLg II** для идентификации всех 6-ти видов удобно, как с практической, так и с экономической точки зрения.

Проведена параллельная идентификация видов *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus* с использованием полимеразной цепной реакции и классического биохимического метода идентификации на основе сахаролитической активности (табл.3).

Таблица 3

Результаты параллельной идентификации бактерий рода *Lactobacillus* с использованием биохимического метода и методики на основе «гнездовой» ПЦР

| № | Штамм                                  | Идентификация биохимическим методом  | Идентификация методом гнездовой ПЦР |
|---|--|--|-------------------------------------|
| 1 | <i>L. plantarum</i> 8 RA-3             | <i>L. plantarum</i>  | <i>L. plantarum</i>                 |
| 2 | <i>L. plantarum</i> 30                 | <i>L. plantarum</i>  | <i>L. plantarum</i>                 |
| 3 | <i>L. fermentum</i> 39                 | <i>L. fermentum</i>  | <i>L. fermentum</i>                 |
| 4 | <i>L. fermentum</i> 90 TC-4            | <i>L. fermentum</i> / <i>L. vaginalis</i>  | <i>L. fermentum</i>                 |
| 5 | <i>L. acidophilus</i> АЦГ <sub>3</sub> | <i>L. acidophilus</i>  | <i>L. acidophilus</i>               |
| 6 | <i>L. delbrueckii</i> 76               | <i>L. delbrueckii</i>  | <i>L. delbrueckii</i>               |
| 7 | <i>L. casei</i> 583                    | <i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> / <i>L. rhamnosus</i>  | <i>L. casei</i>                     |
| 8 | <i>L. rhamnosus</i> 7                  | <i>L. rhamnosus</i> / <i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i>  | <i>L. casei</i>                     |
| 9 | <i>L. rhamnosus</i> 1790               | <i>L. rhamnosus</i> /s <i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> | <i>L. rhamnosus</i>                 |

Из таблицы видно полное совпадение результатов идентификации. В ряде случаев, когда биохимическая идентификация не выявляла четких различий в близкородственных штаммах по спектру утилизируемых углеводов, метод ПЦР позволил уточнить видовую принадлежность близкородственных штаммов.

#### **4. Применение ПЦР для характеристики популяционно-ростовых свойств микроорганизмов рода *Lactobacillus***

Применение метода совместного культивирования требует анализа межштаммовых взаимодействий микроорганизмов в условиях *in vitro*. Пригодными для совместного культивирования считают биосовместимые штаммы, т.е. штаммы взаимоотношения которых расцениваются как симбиоз, мутуализм, нейтрализм или синергизм.

Известен опыт совместного культивирования комбинаций видов *L. plantarum* - *L. salivarius* и *L. fermentum* - *L. salivarius*, что свидетельствует об их высокой способности к сосуществованию [Головач Т.Н., 2004]. Совместное культивирование штаммов *L. fermentum* 39, *L. plantarum* 38 и *L. paracasei* 37, напротив, было неэффективно и приводило к снижению количества живых клеток микроорганизмов всех трех видов в конечном продукте [Лихачева А.Ю., 1992].

Проведено изучение межштаммовых взаимодействий 10 штаммов рода *Lactobacillus*: *L. plantarum* 8 RA-3, *L. fermentum* 39, *L. acidophilus* АЦГ<sub>3</sub>, *L. fermentum* 90 ТС-4. Штаммы *L. casei* 577, *L. plantarum* 30, *L. delbrueckii* 76, *L. rhamnosus* 1790, *L. acidophilus* 1660, *L. casei* 583 выделены из кишечника здоровых людей в лаборатории микробиоценозов и конструирования пробиотиков Нижегородского НИИЭМ и свойства их изучены лишь фрагментарно. По результатам анализа исследуемые штаммы были разделены нами на 3 условные группы: штаммы с сильной антагонистической активностью, штаммы – слабые антагонисты и штаммы со средней антагонистической активностью. К группе биосовместимых лактобацилл со средней антагонистической активностью нами были отнесены следующие

штаммы: *L. plantarum* 8 RA-3, *L. fermentum* 39, *L. fermentum* 90 TC-4, *L. acidophilus* АЩГ<sub>3</sub>, *L. casei* sp. *casei* 583, *L. acidophilus* 1660 (рис. 4).

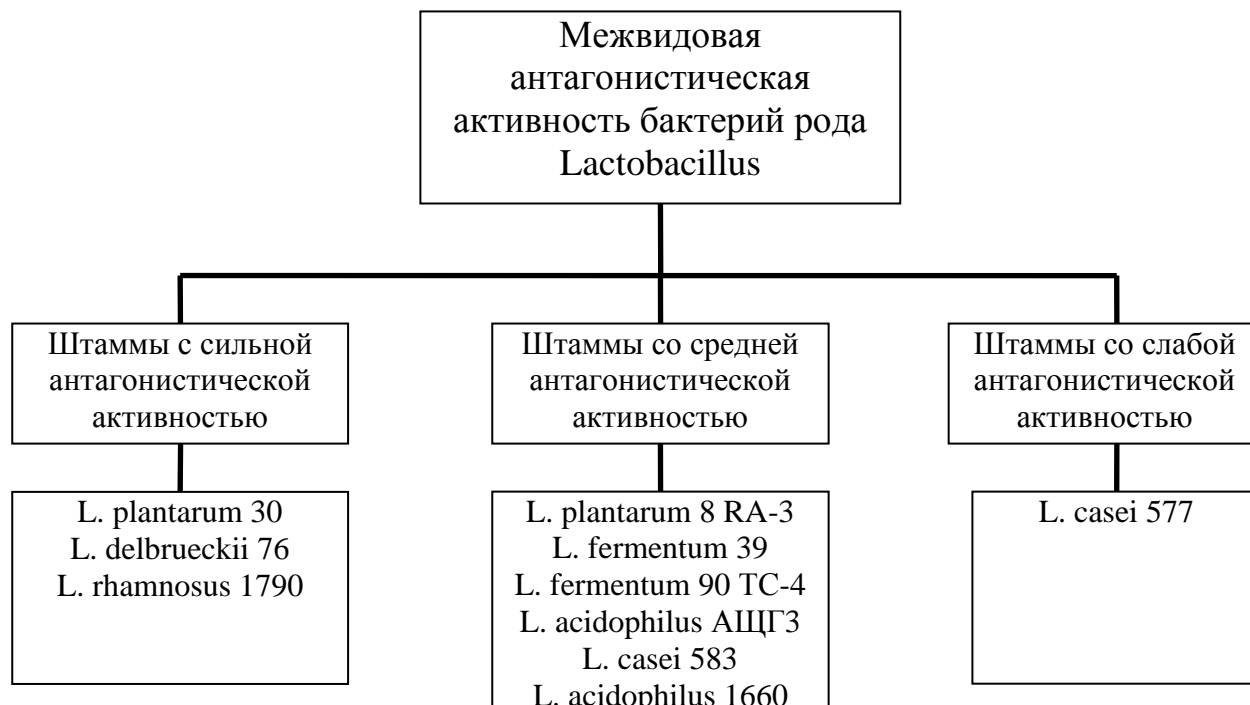


Рис. 4. Схема, демонстрирующая разделение штаммов лактобацилл по степени антагонистической активности

Данные о межвидовых взаимоотношениях, полученные нами, позволили выделить группу бактерий рода *Lactobacillus*, наиболее перспективных в отношении совместного культивирования. Наибольший интерес из этой группы лактобактерий представляют штаммы *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39, так как обладают выраженным антагонизмом по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и устойчивостью к спектру антибактериальных средств, недетерминированной плазмидами [Соколова К.Я. и др., 2004]. В нашем исследовании установлена высокая степень биосовместимости этих штаммов, что определило целесообразность их использования в составе стартерной культуры для совместного культивирования. Указанные штаммы имеют сходный оптимум pH и температуры культивирования (37<sup>0</sup>C), общие

источники углеводного и белкового питания, устойчивы к действию бактериоцинов друг друга и собственных. На следующем этапе работы проведено изучение динамики роста двух штаммов бактерий рода *Lactobacillus*: *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 в условиях отдельного и совместного культивирования с использованием двух методических подходов. С целью контроля титра каждого штамма в смешанной популяции и при отдельном способе культивирования была применена вновь разработанная методика индикации и идентификации бактерий рода *Lactobacillus* на основе ПЦР. Реакцию проводили в 2 стадии: родоспецифичная ПЦР с использованием праймеров FLg и RLgI и видоспецифичная ПЦР с использованием праймеров FERM 1, PLANT 1 и RLgII. Кроме этого, нами была использована дифференциально-диагностическая среда МДС-м, позволяющая проводить дифференциацию и подсчет колоний лактобацилл *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 в смешанной популяции. Для контроля данных метода ПЦР и среды МДС-м применяли титрование проб путем десятичных разведений на жидкой среде МДС-2.

Высевы на среды МДС-м и МДС, и отбор проб для ПЦР проводили в отдельных контрольных точках - 3 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч, 24 ч, 27 ч культивирования. Выбор контрольных точек основывался на опыте предыдущих исследований и позволял проследить длительность и характер всех фаз роста микробной популяции.

В первой контрольной точке (через 3 часа инкубации) количество микроорганизмов в 1 мл среды составляло  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл во всех трех вариантах (I- монокультура *L. plantarum* 8 RA-3; II – монокультура *L. fermentum* 39; III- смешанная культура *L. plantarum* 8 RA-3 + *L. fermentum* 39). Далее по ходу опыта не отмечено существенных различий в динамике роста всех трех вариантов культивирования. Через 6 часов роста количество КОЕ/мл во всех вариантах составило  $1 \times 10^7$ , через 9 часов –  $1 \times 10^8$ , через 12 часов –  $1 \times 10^{10}$ . В точках, соответствующих 24 и 27 часам культивирования плотность микробной

популяции снижалась и составляла  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Длительность лаг-фазы во всех вариантах составляла 3 часа (с 3 по 6 час культивирования), длительность экспоненциальной фазы роста – 6 часов (с 6 по 12 час), затем наблюдался выход на плато – стационарная фаза роста (рис.5,А).

Для всех трех вариантов была определена удельная скорость роста ( $\mu$ ) в течение лаг- и лог фазы. Установлена близкая удельная скорость роста популяции в условиях совместного и раздельного культивирования ( $p < 0.05$ ).

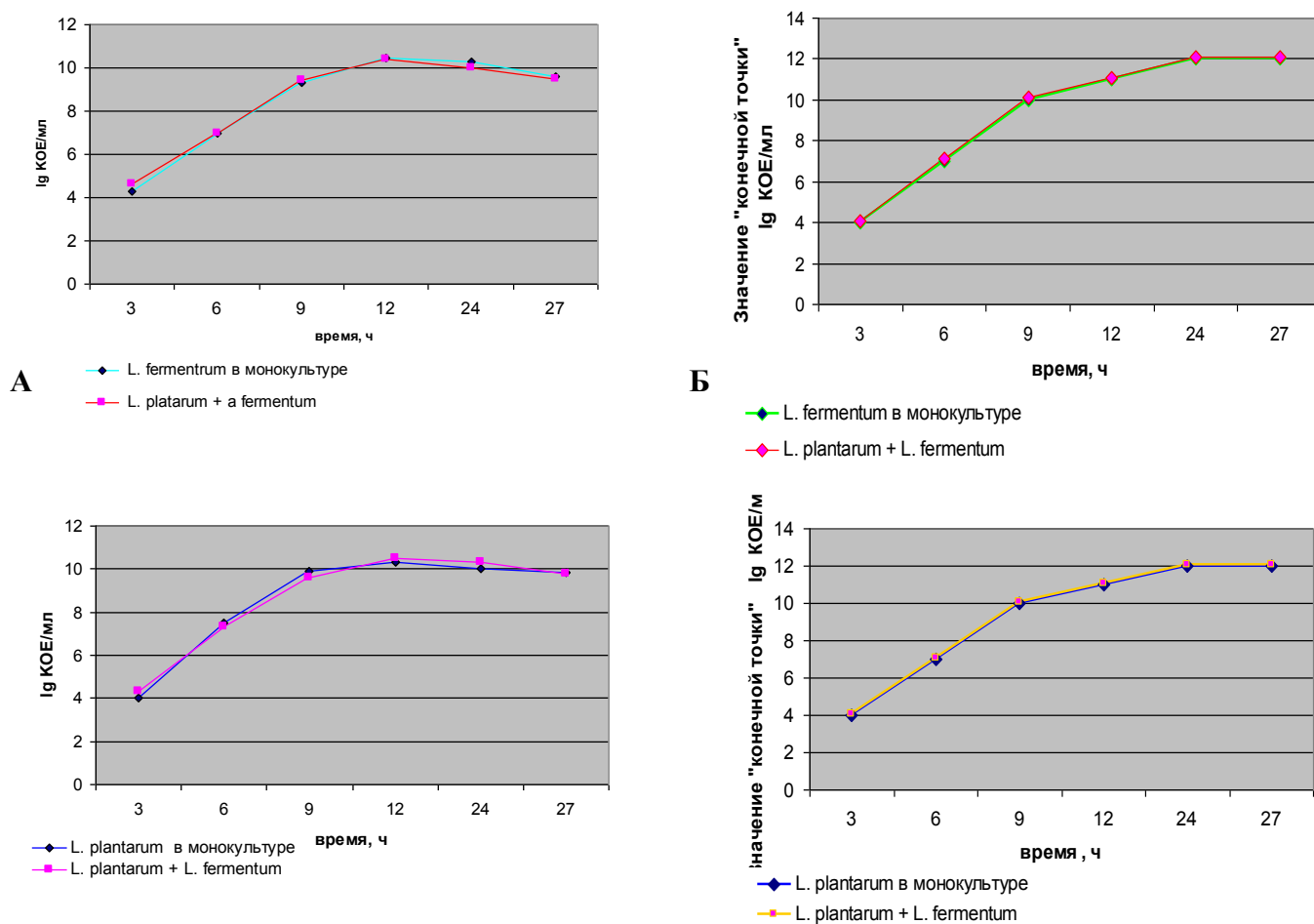


Рис. 5. Развитие микробной популяции *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 при совместном и раздельном культивировании по данным классической микробиологии (высев на среду МДС-м)(А) и по данным ПЦР (Б).

Использование ПЦР позволило определить «конечные точки» (последнее разведение микробной культуры, в котором при постановке ПЦР присутствует ампликон) для каждого контрольного часа культивирования (рис.5, Б). Таким

образом была прослежена динамика роста штаммов *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 при совместном культивировании. С использованием этих данных были определены рекомендуемые контрольные разведения. Наличие ампликонов в этих разведениях при проведении ПЦР служит показателем количества искомого штамма в культуре.

Параллельное использование двух методических подходов – молекулярно-биологической методики на основе ПЦР и классического посева с использованием среды МДС-м позволило точно установить картину динамики роста штаммов-продуцентов в процессе совместного культивирования, характеризовать их взаимодействия как синергидные и доказать целесообразность создания пробиотического препарата на их основе с применением принципа совместного культивирования.

Поставленный опыт позволил определить контрольные разведения, т.е. десятикратные разведения бактериальных культур из которых целесообразно производить высевы на питательные среды и отбирать культуры для постановки родоспецифичной ПЦР в соответствующих периодах культивирования.

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что в рамках представленной работы с использованием штаммов лактобактерий с охарактеризованными биохимическими свойствами создана методика индикации бактерий рода *Lactobacillus* на основе ПЦР гена 16S рНК; подобран наиболее эффективный метод выделения ДНК лактобацилл; установлены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рНК пробиотических штаммов лактобацилл *L. fermentum* 39, *L. plantarum* 8RA-3 и *L. casei* 583; предложена унифицированная комплексная схема видовой идентификации 6-ти промышленно-значимых видов рода *Lactobacillus*: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* с использованием гнездовой ПЦР; вновь созданная методика эффективно апробирована с использованием референтных штаммов лактобацилл, показана достоверная сопоставимость

методики идентификации на основе ПЦР и классического биохимического метода; получены новые данные о межвидовых взаимоотношениях промышленно-значимых лактобацилл; выделена группа биосовместимых видов, перспективных в отношении совместного культивирования; обоснована возможность применения методики в полуколичественном варианте для контроля видового состава и титра штаммов-продуцентов пробиотических препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. На основе изучения биохимических свойств 11-ти вновь выделенных штаммов лактобацилл определена их видовая принадлежность (2 штамма отнесены к виду *Lactobacillus acidophilus*, 1 штамм – к виду *L. delbrueckii*, 2 штамма идентифицированы как *L. casei*, 1 штамм как *L. paracasei*, 2 штамма как *L. plantarum*, 3 штамма как *L. rhamnosus*).
2. Подобрана новая композиция универсальных олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации фрагмента гена 16S рРНК бактерий рода *Lactobacillus* различных биохимических групп.
3. Впервые установлена нуклеотидная последовательность участка гена 16S рРНК штаммов лактобацилл *L. plantarum* 8 RA-3, *L. casei* 583, *L. fermentum* 39.
4. Показана высокая эффективность выделения ДНК лактобацилл из различных субстратов методом нуклеосорбции.
5. Разработана унифицированная схема видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus* с использованием гнездового варианта ПЦР.
6. Впервые установлена биосовместимость штаммов *L. plantarum* 8 RA-3 и *L. fermentum* 39 и показана близкая удельная скорость роста популяции в условиях совместного и отдельного культивирования ( $p < 0.05$ ).
7. Показана возможность применения метода на основе ПЦР с использованием «конечных точек» для контроля динамики роста *L.*

plantarum 8 RA-3 и L. fermentum 39 в условиях совместного культивирования.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **I. Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

1. **Точилина А.Г.** Новые молекулярно-биологические технологии для идентификации пробиотических микроорганизмов/ Точилина А.Г., Соловьева И.В., Новикова Н.А., Соколова К.Я., Белова И.В., Иванова Т.П. // Доклады Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий». – Тула, 2007. – С. 52-54.
2. **Точилина А.Г.** Индикация и идентификация бактерий рода Lactobacillus с использованием полимеразной цепной реакции/ Точилина А.Г., Новикова Н.А., Соколова К.Я., Соловьева И.В., Белова И.В., Иванова Т.П. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008, №3. – С. 69-73.

### **II. Статьи, доклады, тезисы докладов региональных и всероссийских конференций:**

1. Новикова Н.А. Разработка метода индикации лакто- и бифидобактерий на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции / Новикова Н.А., **Мочалова А.Г.**, Соколова К.Я., Соловьева И.В., Голицына Л.Н., Новиков Д.В. // Материалы международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». – М., 2004. – С.59-60.
2. **Точилина А.Г.** Перспективы применения ПЦР для индикации промышленно- значимых штаммов молочнокислых бактерий / Точилина А.Г., Новикова Н.А., Соколова К.Я., Соловьева И.В.// Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения Блохиной «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении



инфекционных заболеваний». – Н.Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2006. – с. 241-245.

3. **Точилина А.Г.** Разработка экспресс-метода для видового контроля штаммов-продуцентов многокомпонентных пробиотиков / Точилина А.Г., Новикова Н.А., Соловьева И.В., Соколова К.Я., Белова И.В., Иванова Т.П. // Материалы 4-го съезда общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова, г. Пущино. – 2006. – С.263-264.

4. **Точилина А.Г.** Совершенствование методов микробиологического контроля БАД к пище / Точилина А.Г., Новикова Н.А., Соколова К.Я. // Журнал «Клиническое питание». Материалы Международного конгресса по пробиотикам. – 2007. – №1-2.

5. Соловьева И.В. Новые биотехнологические аспекты конструирования жидких форм симбиотиков / Соловьева И.В., Соколова К.Я., Григорьева Г.И., **Точилина А.Г.**, Белова И.В., Иванова Т.П.// Доклады Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий». – Тула, 2007. – С. 50-52.