

УДК 577.124.23

Цісарик О.Й., д. с/г н., професор, **Сливка І.М.**, аспірант[©]
*Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького*

МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

Описано основні сучасні підходи до ідентифікації лактобактерій із застосуванням класичних мікробіологічних і новітніх молекулярно-генетичних методів типування мікроорганізмів. Показано, що точність проведення ідентифікації молочнокислих бактерій має велике значення при використанні їх у виробництві продуктів лікувально-профілактичного значення.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, ідентифікація, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Лактобактерії є одними з домінуючих представників нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини і тварин. Завдяки важливій ролі в підтримці здоров'я макроорганізму, бактерії роду *Lactobacterium* широко використовуються для виробництва лікувально-профілактичних препаратів і продуктів харчування, що дозволяють нормалізувати мікрофлору кишечника і знижувати ризик багатьох захворювань. Тому одним з найбільш перспективних напрямків сучасної біотехнології є селекція і виробництво пробіотиків [21].

Пробіотики, згідно найбільш загальному і поширеному визначенню, це живі мікроорганізми або речовини мікробного походження, які мають, при природному способі введення у відповідних дозах позитивний вплив на організм господаря завдяки оптимізації складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту [21].

Сьогодні запропоновано десятки пробіотиків на основі представників індигенної, факультативної та транзитної мікрофлори. Проте створення нових та удосконалення відомих пробіотиків продовжується. Це зрозуміло – змінюючись еволюціонує все живе, постійно набуваючи нових якостей, що обумовлює, необхідність адаптації старих чи пошук нових лікарських препаратів, зокрема і пробіотиків [6]. В зв'язку з цим стали жорсткішими вимоги до пробіотичних препаратів щодо забезпечення їх ефективності і безпечності вживання. Згідно із стандартами ВООЗ, повинна проводитись чітка ідентифікація пробіотичних штамів, вони мають бути генетично стабільними та здатними виживати в умовах шлунково-кишкового тракту, а саме: за низьких значень рН, дії травних ферментів та жовчних кислот. Крім того, пробіотичні культури повинні бути здатними до адгезії, проявляти антагоністичну активність стосовно патогенних мікроорганізмів, бути безпечними та не мати побічних дій на макроорганізм [16]. Тому всі штами, які використовуються у виробництві продуктів функціонального харчування, мають бути точно ідентифіковані на видовому рівні і повинні мати генетичний паспорт [21,6].

[©] Цісарик О.Й., Сливка І.М., 2012

В природі молочнокислі бактерії представлені у вигляді кульовидних (лактококів) і паличковидних (лактобактерій) форм. Родина лактококів об'єднує три роди – *Lactococcus*, *Leuconostoc* і *Streptococcus*. Молочнокислі палички (лактобактерії) включають рід *Lactobacterium*, що має три підроди: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* та *Betabacterium*.

Свою увагу ми зосередили на лактобактеріях, оскільки вважаємо молочнокислі палички перспективними до промислового використання у виробництві функціональних продуктів та вид даного роду бактерій, а саме *Lbm. acidophilum* ми вивчаємо як включення у заквашувальну композицію для виробництва бринзи.

Для визначення родової належності виділених штамів лактобактерій використовують традиційні мікробіологічні методи, які включають дослідження морфолого-культуральних ознак, а також фізіолого-біохімічних властивостей. Це дає змогу попередньо визначити видову належність ізольованих культур, а остаточну ідентифікацію проводять використанням деяких генотипових методів: вміст GC-пар, використання методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), аналіз гена 16S рРНК та інші [15]. Тому необхідно розробити чітку схему ідентифікації молочнокислих паличок із залученням фенотипових і нових генотипових ознак, що дозволить у значній мірі вдосконалити ідентифікацію даної групи мікроорганізмів, а це, в свою чергу, дасть можливість детальнішого вивчення питання щодо спільного культивування різних молочнокислих бактерій.

При відборі промислових штамів лактобактерій доцільно попередньо досліджувати їх пробіотичні властивості (участь у метаболізмі, антагоністична і адгезивна активність, жовчо- і кислоторезистентність, здатність до декон'югації жовчних кислот та асиміляції холестерину) і молекулярно-генетичні, які відображають взаємовідносини штамів на рівні роду, виду, підвиду [14].

Біохімічні властивості. Лактобактерії знаходяться на межі аеробного і анаеробного типів дихання. Вони володіють ефективним метаболізмом ферментації вуглеводів і амінокислот, який зв'язаний з субстратним фосфорилуванням, тобто ферментативним приєднанням фосфату до органічної речовини. Другим рівнем фосфорилування є перетворення карбомідфосфату в CO_2 і NH_3 . Заключним етапом фосфорилування є ферментація аргініну, яка спостерігається в більшості гетероферментативних лактобактерій. Однак, лише деякі види, які утворюють аміак із аргініну, можуть рости на аргініні як єдиному джерелі енергії [12].

При гомоферментативному метаболізмі 1 моль гексози перетворюється в 2 моля молочної кислоти, при гетероферментативному бродінні утворюється 1 моль CO_2 , 1 моль етилового спирту (або оцтової кислоти) і 1 моль молочної кислоти.

Активність ферментації гомо- і гетероферментативних молочнокислих паличок відрізняється наявністю або відсутністю ферментів альдолаз і фосфокетолаз. Гетероферментативні лактобактерії продукують фосфокетолази, а гомоферментативні види – альдолази. В зв'язку з цим гомоферментативні

молочнокислі палички не можуть ферментувати пентози, котрі гетероферментативні лактобактерії розщеплюють за допомогою фосфокетолаз до молочної і оцтової кислот [12].

У процесі ферментації вуглеводів утворюється молочна кислота у формі L- або D-ізомерів. Ізомери молочної кислоти утворюються різними шляхами метаболічної ферментації залежно від конфігурації лактатдегідрогенази. Лактатдегідрогенази різних видів молочнокислих бактерій відрізняються один від одного електрофоретичною рухливістю і кінетичними властивостями [24].

Багато лактобактерій проявляють добре виражену сахаролітичну властивість. Крім глюкози і лактози, багато гомо- і гетероферментативних видів інтенсивно використовують пентози, інколи навіть активніше ніж глюкозу [12].

Гетероферментативні молочнокислі бактерії ферментують фруктозу, оскільки вони синтезують фермент – манітдегідрогеназу, яка здійснює відновлення фруктози до маніту. Продуктами бродіння фруктози також є лактати, ацетати і вуглекислий газ.

Лактобактерії мають слабку протеолітичну активність і тому не ростуть в субстратах, де єдиним джерелом азоту є білок, тобто, де відсутні вільні амінокислоти. Але одночасно є штами молочнокислих бактерій, які можуть розщеплювати білки. Такі протеолітично активні штами підбирають для складу мікробіологічних композицій для сиру [12].

Лактобактерії не перетворюють нітрати в нітрити, не утворюють пігменти, деякі види продукують каталазу, яка розщеплює пероксид водню [12].

Кислотостійкість молочнокислих бактерій. Кислотостійкість є однією із обов'язкових властивостей, за якими вибирають штами-пробіотики. З одного боку, це протидія шлунковому соку, а з іншого – кислому середовищу ферментованого продукту [2]. Молочнокислі бактерії під час свого росту продукують значну кількість кислот, тому кислототолерантність є цінним філогенетичним надбанням для виживання цих груп мікроорганізмів.

Адаптація до низьких рН забезпечується низкою захисних механізмів клітин, в основі яких є здатність до підтримки кислотного градієнту (ΔpH), оскільки цитоплазма має бути відносно лужною навіть у кислому середовищі [11]. Встановлено, що кожний мікроорганізм характеризується власним мінімальним значенням внутрішньоклітинного рН, зниження якого призводить до колапсу транспорту нутрієнтів і, як наслідок, втрати життєздатності. Внутрішнє рН не є стабільною величиною і змінюється разом зі зміною рН зовнішнього середовища, зберігаючи характерний для окремого виду градієнт. Це забезпечується АТФ-азами, локалізованими на цитоплазматичній стороні клітинної мембрани, і здатними до виштовхування протонів із цитоплазми у зовнішнє середовище. Ефективність процесу залежить від кількості і активності АТФ-аз у клітинній мембрані та від концентрації та типу органічних кислот у середовищі [11].

Іншим механізмом, яким молочнокислі бактерії можуть алкалізувати своє кисле зовнішнє середовище, є аргініндеіміназний шлях, через який відбувається

перетворення аргініна до орнітіна, диоксиду вуглецю та амонію. На основі цього встановлено, що ферменти, які задіяні у цьому механізмі, характеризуються високою стійкістю до низького рН [11].

Стійкість до жовчі. У тонкому кишечнику молочнокислі бактерії піддаються дії жовчних кислот, які проявляють антимікробну активність шляхом хімічного пошкодження клітинних мембран та інактивації ферментів. Формування стійкості до жовчних кислот у лактобактерій забезпечується ущільненням клітинної стінки, зміні структури та функцій ферментів [3].

Стійкість до жовчі, загалом, є штамовою ознакою і визначається природними особливостями окремих культур [3,7].

Досі не з'ясовано, якого рівня жовчостійкості слід дотримуватися під час відбору культур молочнокислих бактерій, для забезпечення їх виживання в макроорганізмі, хоча встановлено, що кількість клітин у кишковому тракті жовчостійкого штаму *Lbm. acidophilum* більше, ніж штаму з низькою стійкістю до жовчі [3].

В цілому, свідчення щодо жовчостійкості штамів доволі суперечні, що визначається різними умовами та методами досліджень, такими як використання жовчі різного походження (людської, бичачої або спеціальних препаратів окремих і сумішей декон'югованих і кон'югованих жовчних кислот) та різних критеріїв оцінки (наприклад, ступінь виживання або чисельність) тощо [3].

Адгезивні властивості молочнокислих бактерій. Наявність адгезивних властивостей у молочнокислих бактерій є одним із критеріїв їх ефективності у складі біопрепаратів [13]. Адгезія являє собою, здатність лактобактерій приживлятися на слизових оболонках різних порожнин макроорганізму. Такі властивості є як у нормальної, так і у патогенної мікрофлори травного тракту. Одним із основних критеріїв пошуку перспективних штамів молочнокислих бактерій є їх адгезивність. У більшості видів лактобактерій, адгезивні властивості корелюють із високою антимікробною дією та лізоцимною активністю [13].

Специфічна взаємодія молочнокислих бактерій з епітеліальними клітинами забезпечується спеціальними поверхневими структурами, так званими адгезинами. Механізм зв'язку між контактуючими поверхнями визначається комплементарністю адгезинів зі структурами, що виконують функцію рецепторів. Процес адгезії дозволяє лактобактеріям втримуватися на поверхні епітеліальної тканини і забезпечувати можливість ефективної колонізації слизової оболонки [8].

Швидке заселення шлунково-кишкового тракту макроорганізму молочнокислими бактеріями з пробіотичними властивостями сприяє нормалізації якісного і кількісного складу мікрофлори, стимулює відновлюючий процес слизової оболонки кишечника. Колонізація шлунково-кишкового тракту молочнокислими бактеріями відіграє важливу роль в захисті слизової оболонки від заселення патогенними і умовно-патогенними бактеріями, завдяки конкуренції за рецептори для зв'язування [21]. Однак, вчені

дослідили, що здатність прикріплюватись до слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, це не лише видова, а й штамова специфічність і залежить вона від поверхневих властивостей бактеріальної клітини [7].

Таким чином, важливим критерієм для відбору штамів молочнокислих бактерій для використання в пробіотичних препаратах є висока здатність лактобактерій до адгезії.

Антагоністична активність молочнокислих бактерій. Здатність лактобактерій пригнічувати розвиток інших таксономічних груп є однією з найважливіших біологічних властивостей цих мікроорганізмів [8]. Антагоністична дія лактобактерій по відношенню до патогенної і умовно патогенної мікрофлори пов'язана перш за все із продукуванням органічних кислот, які є кінцевими продуктами їх метаболізму. Це органічні кислоти (молочна й оцтова), пероксид водню і сполуки, відомі як бактеріоцини (лізоцим, нізин, булгарикан і булгарин, ацидофілін, ацидолін, лактобrevін, реутерин, лактоцидин). У процесі метаболізму багато з них закисляють рН до 4,5 і нижче. Самі лактобактерії толерантні до низького рН, тому його зниження до значення 4,5 є бактеріоцидним для ряду штамів *Micrococcus* sp. і *B. cereus* [20]. Продукування антибіотиків і бактеріоцинів є ефективними в боротьбі із мікроорганізмами, чутливими до дії цих метаболітів. Це сальмонели, клостридії, вібріони, стрептококи, стафілококи, лістерії та деякі види грибів [9].

Також сприятливий вплив лактобактерій на здоров'я макроорганізму визначається тим, що вони здійснюють синтез вітамінів групи В та К, незамінних амінокислот, біологічно активних речовин, поліпшують засвоюваність лактози, знижують вміст холестерину в крові, проявляють імуномодельуючу, антимурагенну та антиканцерогенну активність [8].

Молекулярно-генетичні методи дослідження та ідентифікації лактобактерій. Для остаточної ідентифікації молочнокислих бактерій виділених із різних екологічних перспективним є використання нових методів вивчення властивостей лактобактерій, які відображають взаємовідносини штамів на рівні роду, виду та підвиду [20]. Оскільки на сьогодні біохімічні і морфологічні властивості лактобактерій є основними і єдиними критеріями міжродової і видової ідентифікації цих мікроорганізмів, то альтернативною класичною біохімічною ідентифікацією може стати метод генотипування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [18].

Завдяки розвитку молекулярно-генетичних методів і застосуванню їх у систематиці молочнокислих бактерій їх класифікація була удосконалена і виявлено нові види роду *Lactobacterium*, зокрема *Lactobacillus pantheri*, *L. thermotolerans*, *L. jaguar* та ін., а також це дає можливість детальнішого вивчення питання щодо спільного культивування різних лактобактерій [10].

Розробка нових і оптимізація відомих молекулярно-генетичних методів індикації і точної видової ідентифікації бактерій роду *Lactobacterium* є актуальною, має практичне значення і є сучасним завданням, якому приділяють велику увагу, як вітчизняні, так і закордонні дослідники. Однак, не дивлячись на глибоке вивчення цього питання, на сьогодні ще не існує оптимальної

уніфікованої лабораторної методики на основі ПЛР, яка дозволить проводити індикацію та ідентифікацію видів молочнокислих бактерій [18].

В основі методу ПЛР лежить багатократне копіювання за допомогою ферменту ДНК-полімерази певного фрагменту ДНК за принципом комплементарності. При багаторазовому повторенні циклів реплікації відбувається збільшення числа копій фрагменту ДНК. Це дозволяє із лактобактерій, які знаходяться в дослідному матеріалі, отримати необхідну кількість ДНК для їх ідентифікації [17]. Тому із появою методу ПЛР стала можливою розробка різних варіантів праймерів для визначення багатьох видів молочнокислих бактерій на основі будови генів рибосомної РНК [1]. Однак, на даний час праймери розроблені не для всіх існуючих видів лактобактерій, а здебільшого лише для видів, що використовуються для виробництва пробіотичних препаратів і біопродуктів.

Філогенетичні зв'язки між живими організмами можна прослідкувати шляхом порівняння послідовності генів або їх окремих ділянок, які кодують рРНК. Особливо широко в дослідженнях таксономічного положення бактерій використовують послідовності генів малої (16S) субодиниці рРНК, тому що вона має менш подовжений і мінливий ген в порівнянні із великою (23S) субодиницею [10]. Метод порівняння послідовності генів 16S рРНК найчастіше використовується для встановлення видової належності мікрофлори в молочних продуктах. Розмір генетичної детермінанти 16S рРНК у різних видів лактобактерій коливається близько 1500 п.н. і кілька разів дублюється в геномі. Копії цих генів розділені спейсерними областями різного розміру. Відомо, що бактерії роду *Lactobacterium* мають дві спейсерні області, які відрізняються за розміром в області між генами 16 і 23S рРНК. Ген 16S рРНК володіє як консервативними, так і варіабельними ділянками нуклеотидної послідовності, що дозволяє використовувати його як для визначення роду, так і для видового типування молочнокислих організмів [10].

Метод риботипування дозволяє суттєво зменшити кількість фрагментів ДНК, що аналізуються. Він направлений на виявлення у штамів, що вивчаються, відмінностей у кількості рибосомних оперонів, а також рестрикційного поліморфізму їх нуклеотидних послідовностей. Для цього продукти рестриктазного гідролізу бактеріальної ДНК розділяються методом електрофорезу в агарозному гелі, а потім гібридизуються з ДНК-зондами. (Такі зонди являють собою гени, що кодують рРНК, вони мають здатність гібридизуватися з бактеріальною рДНК.) Даний метод може бути застосований як для встановлення видової належності ізолятів, так і для їх внутрішньовидової класифікації. Часто, у випадку неефективного аналізу звичайного рестрикційного профілю ДНК, риботипування дозволяє розрізнити штами одного і того ж серотипу в межах виду [19].

Рестрикційний аналіз ампліфікованих рибосомних ДНК (amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)) являє собою аналіз поліморфізму довжин фрагментів рестрикції ампліфікованих генів. Вся рДНК або її частина ампліфікується методом ПЛР і одержані фрагменти розрізаються ферментами

рестрикції. Число і розмір одержаних фрагментів ДНК варіює, залежно від сайтів рестрикції всередині даної специфічної рДНК (а також від кількості рРНК кодуєчих оперонів на хромосомі) і, таким чином, внаслідок чого можна отримати профіль, специфічний до даної послідовності [19].

Література

1. *Belkum A., Struelens M., Visser A. et.al.* Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology // *Clin Microbiol. Rew*– 2001. – 14, N 3. – P. 547–560.
2. *Bengmark S.* Colonic food: pre and probiotics. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (1 Suppl): S57[review].).
3. *Chou L.S., Weimer B.* Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* // *J. Dairy Sci.* – 1999. 82. – N 1. –P. 23-31.
4. *Collins M.D., Gibson G.R.* Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – 69, N 1 (suppl). – P. 1052S–1057S.
5. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. – London, 2002. – P. 3-56.
6. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials / C. Dunne [et al] // *Antonie van Leeuwenhoek.* – 2003. - № 76 – P. 279–292.
7. *Tallon R., Arias S., Bressollier P.* Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds // *J. Microbiol.* – 2007. – 102. N 2. – P. 442 – 451.
8. *Бондаренко В.М.* Пробиотики и механизмы их лечебного действия / В.М. Бондаренко [и др.] // *Эксперим. клин. гастроэнтерол.* - 2004. - № 3. - С. 83-87.
9. *Глушанова Н.А.* Биологические свойства лактобацилл // *Бюл.сибирской медицины.* – 2003. - №4. – С. 13-16.
10. *Дармов И.В.* Молекулярно-генетические характеристики штаммов лактобацилл, входящих в препарат «Билакт» // *Материалы международной научно-практической конференции «Пробиотические микроорганизмы-современное состояние вопроса и перспективы использования.* – Москва, 2002. – С. 38-40.
11. *Квасников Е. И.* Промышленная микробиология / Квасников Е.И., Несторенко О.А. – М.: Высшая школа, 1989. – 540 с.
12. *Квасников Е. И.* Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Несторенко. — М. : Наука, 1975. — С. 148-160.
13. *Квасников Е.И.* Биология молочнокислых бактерий. АН Уз ССР, 1960. - Ташкент, 352 с.
14. Кігель Н.Ф. Технології бактеріальних препаратів для функціональних продуктів і біологічно активних добавок. – автореф. дис. на здобуття наук. ступ. док. техн. наук: спец. 03.00.20- біотехнологія / Н.Ф. Кігель. – Київ, 2003. – 41 с.

15. Коваленко Н.К., Лащевский В.В. Применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации молочнокислых бактерий // Молочна промисловість. – 2003. – №1(4). – С. 24-25.
16. Коваленко Н.К. та ін. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і біфідобактерій // Мікробіол. журн., 2010, Т.72, №1. – 9-17.
17. Точилина А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008, №3. – С. 69-73.
18. Точилина А.Г. Новые молекулярно-биологические технологии для идентификации пробиотических микроорганизмов // Доклады Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологий». – Тула, 2007. – С. 52-54.
19. Полтавська О.А., Коваленко Н. К., Таксономічне положення біфідобактерій і сучасні методи їх ідентифікації // Мікробіологічний журн., 2009, Т.71, №3. – 62-72.
20. Тараканов Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных // Ветеринария. — 2000. — № 1. — С. 47–54.
21. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. / Б.А. Шендеров – М.: Издательство «ГРАНТЬ», 2001. – Том III: Пробиотики и функциональное питание. – 288 с.

Summary

Tsisarik O.Y., Slyvka I.M.

*Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies
named after S.Z.Gzhytskyj, Lviv, Ukraine*

METHODS FOR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA

The question of creation of necessary conditions for accurate identification of lactic acid bacteria has been revealed, as well as the basic principles of novel molecular-genetic approaches for microorganisms' typing. It is shown that the accuracy of identification lactic acid bacteria is important when they are used in the production of health-care value.

Key words: *lactic acid bacteria, identification, polymerase chain reaction (PCR).*

Рецензент – к.вет.н., професор Козак М.В.