

УДК 576.8.095

**Ганбаров Х.Г.<sup>1</sup>, Моджаррад Х.С.<sup>1</sup>, Мохаммад Реза Боняди<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Бакинский государственный университет (Азербайджан)

<sup>2</sup> Тебризский медицинский университет (Иран)

## **ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СПОНТАННЫХ ПРОСТОКВАШ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ КИСЛОТО И ЖЕЛЧЕУСТОЙЧИВОСТИ**

**Kh. Ganbarov<sup>1</sup>, S. Mojarrad Xangah<sup>1</sup>, M. Reza Bonyadi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Baku State University, Azerbaijan

<sup>2</sup> Tabriz University of Medical Sciences, Iran

### **IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA OF THE GENUS LACTOBACILLUS, ISOLATED FROM SPONTANEOUS SOUR CLOTTED MILK AND INVESTIGATION OF THEIR ACID RESISTANCE AND BILE TOLERANCE**

*Аннотация.* Идентификация молочнокислых бактерий, выделенных из спонтанных простокваш (простокваш домашнего приготовления), используемых в Иранском Азербайджане, была осуществлена с помощью метода ПЦР-анализ нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA. Восемь штаммов были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum*, а семь штаммов были отнесены к виду *Lactobacillus acidophilus*. Изучение кислото- и желчеустойчивости выделенных штаммов молочнокислых бактерий показало, что при кислотности pH 2,5 два штамма являются чувствительными (10 – 20% выживание), 5 штаммов – толерантными (26 – 48% выживание), 6 штаммов – устойчивыми (52 – 76% выживание) и 2 штамма – более устойчивыми (84 – 86% выживание). По отношению к желчи два штамма оказались чувствительными (10 мин задержки роста), 3 штамма – толерантными (20 – 30 мин задержки роста), 6 штаммов – устойчивыми (40 – 50 мин задержки роста) и 4 штамма – более устойчивыми (60 мин задержки роста).

*Ключевые слова:* молочнокислые бактерии, идентификация, ПЦР-анализ, секвенирование, ген 16s r РНК, кислотоустойчивость, желчеустойчивость.

*Abstract.* PCR-analysis of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene was used to identify lactic acid bacteria, isolated from dairy products (sour clotted milk) from the Azerbaijan region of Iran. Eight strains were identified as *Lactobacillus plantarum* and seven strains – as *Lactobacillus acidophilus*. The analysis of acid and bile tolerance of the strains isolated from sour clotted milk showed that at pH 2.5 two strains were sensitive (10%–20% survival), 5 strains – tolerable (26%–48% survival), 6 strains – resistant (52%–76% survival) and 2 strains – more resistant (84%–86% survival). As for the bile tolerance, two strains were sensitive (10 min delay in growth), 3 strains were tolerant (20–30 min delay), 6 strains were resistant (40–50 min delay) and 4 strains were more resistant (60 min delay).

*Key words:* lactic acid bacteria, identification, PCR-analysis, sequencing, 16S rRNA gene, acid tolerance, bile tolerance.

С древних времен значительное количество молока использовалось для производства традиционных кисломолочных продуктов. Наряду с промышленным производством, во многих странах мира, различные кисломолочные продукты получают в домашних условиях с применением спонтанной закваски (закваски с неизвестным микробным составом). Эти продукты используются не только как пищевые продукты, но и как лечебно-диетическое средство [1; 10; 16]. Производство кисломолочных продуктов связано с использованием молочнокислых бактерий. В последние десятилетия большое внимание уделяется поиску новых штаммов молоч-

нокислых бактерий с целью использования их в производстве пробиотиков и получения антимикробных препаратов. В качестве пробиотиков обычно используют бактерии рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* и *Streptococcus* [1; 11]. Главным критерием для *in vitro* селекции пробиотических микроорганизмов является: устойчивость к кислотности и желчи, антибактериальная и антифунгальная активность [20; 22].

Идентификация молочнокислых бактерий по морфологии, физиологическим потребностям и биохимическому тесту недостаточно эффективны, так как многие бактериальные популяции имеют сходную потребность к питательным субстратам и растут в сходных условиях среды [18]. Метод ДНК/ДНК-гибридизация является «золотым стандартом» видовой идентификации, но трудоемкость и высокая стоимость не позволяет использовать его как рутинный метод. Альтернативным подходом является анализ последовательности ДНК [2; 7; 17]. На современном этапе – «секвенирование ДНК» недорогой и быстрый метод, позволяющий создавать общедоступные базы данных нуклеотидных последовательностей. Этот метод обладал высоким таксономическим разрешением, но необходимо подобрать генетические маркеры, позволяющие надежно дифференцировать молочнокислые бактерии до вида. Комитет по переоценке бактериальных видов рекомендует проведение анализа пяти генов, которые имеют достаточную информацию для определения видовой принадлежности микроорганизмов [2; 6; 21]. В настоящее время изучение нуклеотидной последовательности генов туф [5],  $rH_2S$  и  $groA$  [15],  $hsp60$  [4]  $groB$  [3; 13] успешно применяется для идентификации бактерий, в том числе молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*. Данный метод идентификации можно применять как к грамположительным, так и к грамотрицательным бактериям [14]. В данное время в качестве генетического маркера для идентификации молочнокислых бактерий широко используется ген 16S rRNA [12; 19].

Целью данной работы явилось изучение биохимических свойств и генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных из спонтанных простокваш с территории Ирана и изучение их кислото- и желчеустойчивости.

## Материалы и методы исследования

**Выделение молочнокислых бактерий.** Образцы простокваш домашнего приготовления собирали асептически в стерильную посуду и до обработки помещали в холодильник. Из отобранных образцов были приготовлены суспензии, и из каждой суспензии по 0,5 мл добавляли в жидкую «МРС»-среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20, пептон – 8, дрожжевой экстракт – 4,  $K_2HPO_4$  – 2, твин-80 – 1, диаммоний цитрат – 2, натрий ацетат – 5,  $MgSO_4$  – 2,  $MnSO_4$  – 0,04, агар – 15. После инокуляции культуры инкубировали при 37°C в течение 24 час. в аэробных условиях. Для быстрого выявления кислотоустойчивых молочнокислых бактерий смешанные культуры, выращенные в жидкой «МРС»-среде, переносили в буферный раствор с кислотностью pH 3 и поддерживали в течении 2,5 часа. При этом кислоточувствительные штаммы погибали. Из обработанной таким образом культуры брали 10 мл и помещали в свежую жидкую «МРС»-среду для получения накопительной культуры. После 24 ч. инкубации 1 мл суспензии переносили в агаризованную «МРС»-среду, размазывали шпателем и инкубировали при 37°C в микроаэрофильных условиях 48-72 час. Образующиеся колонии микроскопировали, окрашивали по Грамму и проверяли их каталазную активность [9].

Грамположительные и каталазанегативные штаммы переносили в жидкую «МРС» среду с 25% глицерином и 25% обезжиренным молоком и сохраняли при - 80°C.

**Выделение ДНК и определение нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA.** Хромосомальную ДНК бактериальных клеток изамировали по методу Kate Wilson [7]. Количество экстрагированной ДНК измеряли электрофотометрически на 1%-ном

агарозном геле, используя 40 мМ трис-ацетат буфер и 1мМ ЕДТА и этидий бромид (0,5 мг/мл).

ПЦР для 16S rRNA дальше дифференцировался рестрикционным анализом, используя ферменты Tag 1(DNA polymerase). Смесь содержала 150 нг ДНК, 1Ег «Tag DNA polymerase» 0,2 мМ каждого ДНТФ, 1 мл. буфер, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15н моль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации осуществлялась при следующих условиях: денатурация при 95°C за 4 мин, ренатурация при 59°C за 55 сек, выпрямление ДНК при 72°C за 5 мин. Ампликоны анализировались в 1%-ом агарозном геле с этидий бромидом (0,5мг/мл), ПЦР продуктов определяли по сравнению с цепью 1 кв ДНК. ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора DNA Engine Tedrad 2 Cycler PTC-0,240 (Bio-Rad).

При очистке ПЦР продуктов использовали ферментативный метод (7). Реакцию секвенирования проводили с применением «Bid-Dye Terminator V 3.1 Cycle sequencing Kit» с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе «3730 x 1DNA Analyzar» (Applied Biosystems). Полученные нуклеотидные последовательности гена исследуемых культур сравнивали с последовательностью депонированной в NCBI Gen Bank 16S rDNA генома, присущего различным видам бактерий рода *Lactobacillus* [7].

**Изучение кислотоустойчивости штаммов бактерий.** Культуры штаммов молочнокислых бактерий выращивали в жидкой «MRS»-среде при 37°C 24 ч., после чего переносили в буферный раствор с рН 2,5 и поддерживали 3 часа. Затем культуру выращивали на агаризованной «MPS» среде и подсчитывали количество выживших клеток молочнокислых бактерий [9].

**Изучение желчеустойчивости штаммов бактерий.** В жидкую «MPS»-среду, содержащую 0,3% бычьей желчи, вносили культуры штаммов бактерий и инкубировали при 37°C. В качестве контроля использовали жидкую «MPS»-среду без желчи. Рост контролировали по оптической плотности при

600 нм на спектрофотометре «Genesystem S» [8; 9].

## Результаты и их обсуждение

Из 4-х видов простокваши домашнего приготовления были выделены 15 штаммов бактерий. Микроскопическое исследование показало, что они имеют палочковидную форму. При окрашивании по Грамму они оказались грамположительными, а каталазный тест свидетельствовал об их каталазанегативности. Эти признаки характеризуют штаммы как представителей рода *Lactobacillus*.

Амплификация фрагмента гена 16S rRNA размером 1500 н.п. методом ПЦР 15-и штаммов представлена на рис.1. Нуклеотидная последовательность гена исследованных 8-ми штаммов была характерна (98%) для вида *Lactobacillus plantarum* (рис.1), а у 7 штаммов – была сходна (94%) с видом *Lactobacillus acidophilus* (рис.2). Таким образом, 8 штаммов по гену 16S rRNA была идентифицированы как *Lactobacillus plantarum*, а 7 штаммов – как *Lactobacillus acidophilus*. Уровень генетического родства гена 16S rRNA исследуемых штаммов 8, 46, 48, 49, 57, 60, 77, 88 по отношению *Lactobacillus plantarum* составил 98%. Нуклеотидная последовательность гена 16S rRNA штаммов 32, 44, 51, 64, 70, 71 и 82 была идентична с *Lactobacillus acidophilus*. Идентичность нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA составила 94%.

Кислотоустойчивость является одним из основных свойств, показывающим жизнеспособность пробиотических (молочнокислых) бактерий) при попадании в кислую среду желудка [8]. После желудка эти бактерии попадают в двенадцатиперстную кишку, где контактируют с желчью. Следовательно, указанные бактерии должны быть устойчивыми к кислотности в желудке и желчи. Изучение кислотоустойчивости показало, что штаммы *Lactobacillus acidophilus* проявляют достаточную устойчивость к высокой кислотности среды. Так, выживаемость *Lactobacillus acidophilus* штаммов 64 и 70 составляла, соответственно, 84 и 86% (табл.). Устойчи-

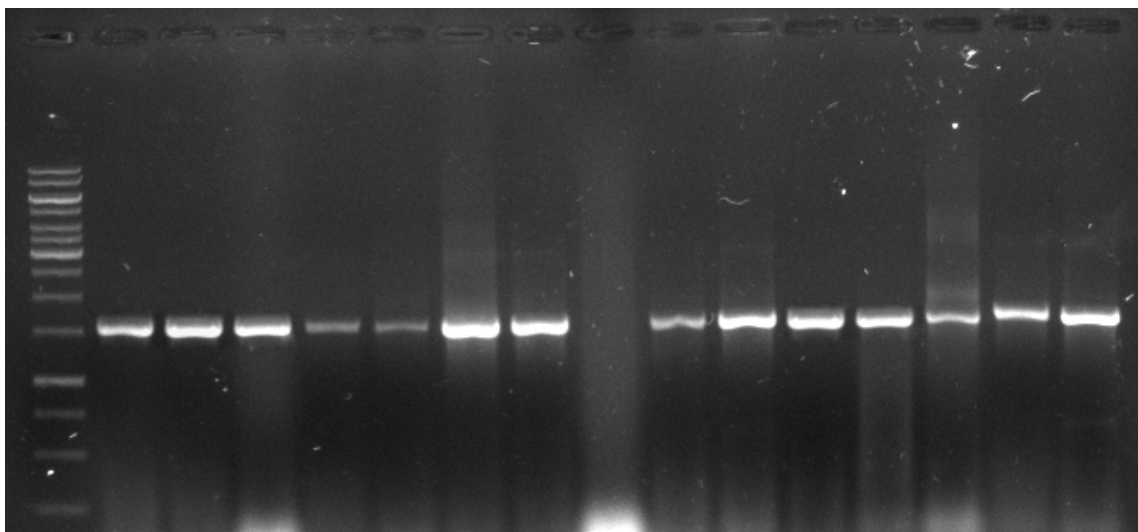


Рис. 1. Электрофорерограмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента 16S rDNA гена для выделенных изолятов (штаммов) *Lactobacillus plantarum*

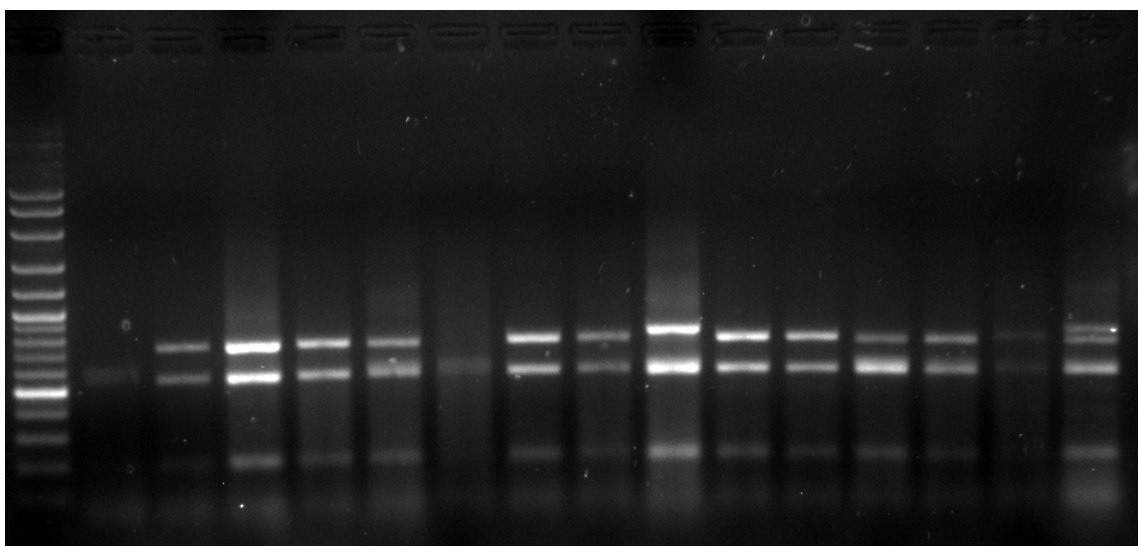


Рис. 2. Электрофорерограмма ПЦР продуктов амплификации фрагмента 16S rDNA гена для выделенных изолятов (штаммов) *Lactobacillus acidophylus*

вость к кислотности у штаммов *Lactobacillus plantarum* значительно варьировала, и выживаемость была в диапазоне от 5 до 58%. Наибольшую устойчивость проявляли штаммы *L. plantarum* 57 и 60, у которых выживаемость составляла, соответственно, 58 и 52% (табл.). Следовательно, устойчивость к кислотности среды у штаммов *L. acidophylus* была в 1,5 – 4,8 раза больше устойчивости штаммов *L. plantarum*.

Изучение толерантности молочнокислых бактерий к желчи показало, что у *Lactobacillus acidophylus* штаммов 44 и 51 время задержки роста составляло, соответственно, 40 и 30 мин., а у кислотоустойчивых штаммов 64, 70, 82 и 32 время задержки роста составляло, соответственно, 60, 60, 50 и 50 мин. (табл.). Такая же закономерность наблюдалась у штаммов *L. plantarum*. Так, у штаммов 57, 60, 77 и 48, проявляющих высокую кислотоустой-



## Устойчивость молочнокислых бактерий к кислотности и желчи

Виды бактерий	Штаммы бактерий	Выживаемость клеток при кислотности рН 2,5 (%)	Время задержки роста при 0,3% желчи (мин)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	32	69	50
	34	56	40
	51	48	30
	64	84	60
	70	86	60
	71	54	50
	82	76	50
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8	10	10
	46	26	20
	48	45	40
	49	34	20
	57	58	60
	60	52	60
	77	48	50
	88	20	10

чивость, время задержки роста, составляло, соответственно, 60,60, 50 и 40 мин., а у слабокислотоустойчивых штаммов 8, 46, 88 и 49 время задержки роста составляло, соответственно, 10, 20, 10 и 20 мин.

Следовательно, у штаммов обладающих высокой устойчивостью к кислотности наблюдается низкая устойчивость к желчи, и наоборот, у штаммов, обладающих высокой устойчивости к желчи наблюдается низкая устойчивость к кислотности. Следует отметить, что кислотоустойчивость штаммов *Lactobacillus acidophilus* была в 1,5 – 4,8 раза выше, чем у *Lactobacillus plantarum*, а устойчивость к желчи у *L. plantarum* была в 1,5 – 3 раза выше, чем у *L. acidophilus*.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Ганбаров Х.Г., Джафаров М.М. Микробиология лечебных и диетических кисломолочных продуктов.– Баку, 2001.– 130 с.
2. Шевцов А.Б., Кушгулова А.Р., Кожаметов С.С. и др. Идентификация бактерий рода *Lactobacillus* на основе анализа фрагмента гена-бета-субъединиц рНК- полимеразы гроб // Вестник МГУ, сер. «Биология».– 2011.– № 1.– С. 26-31.
3. Adekambi T., Drancourt M., Raoult D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists // Trends in Microbiology.– 2009.– Vol. 15, № 1.– P. 160-171.
4. Bolaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp 60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation // Appl. Environ. Microbiol.– 2008. – V. 74.– P. 208-215.
5. Chavagnat F., Haueter M., Jimeno I., Casey M. Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli // FEMS Microbiol. Let.– 2002. – V. 217.– P. 117-183.
6. Claesson M., Sinderen D., O. Toole P. The genus *Lactobacillus* genomic basis for understanding its diversity // FEMS microbial. Let., 2007. – V. 269, № 1.– P. 22-28.
7. Delfederico L., Hollmann A. molecular identification and typing of *Lactobacilli* isolated from kefir grains // Jour. Dairy Research.– 2006. – V. 173, № 2.– P. 20-27.
8. Gilliland S., Staley T. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct // Jour. Dairy Scince.– 1984. – V.67, № 12.– P. 3045-3051.
9. Hyronimus B., Le M. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria // Intern. J. of Food microbiol.– 2000. – V. 61, № 2-3.– P. 193-197.
10. Kao Y., Lin Y., Shyu Y. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis // Food Research Int.– 2007.– V. 40, № 1.– P. 71-79.
11. Klein G., Pack A., Taxonomy and physiology of pro-

- bictic lactic acid bacteria // *Inter J Food microbial.* – 1998. – V. 41, № 2. – P. 103-125.
12. Ko K., Kin I. M., Kin I. W., Jung B., Kook Y. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiple PCR // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – V. 41, № 7. – P. 2908-2914.
  13. Morse R., Collins M., Hanlon K., Wallbanks S., Richardson P. Analysis of the beta subunit of DNA dependent RNA polymerase does not support the hypothesis in *forred* from 16S rRNA analysis that *Olnococcus olni* is a tachytelic bacterium // *Int. Syst. Bacteriol.* – 1996. – V. 46, № 4. – P. 1004-1009.
  14. Morse R., Hanlon K., Collins M. Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA dependent RNA polymerase of Gram-positive and Gram-negative bacteria // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 1477-1484.
  15. Naser S., Dawyndt P., Hoste B., et al., Identification of *Lactobacillus* by *phes* and *rpoA* gene sequence analyses // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. V. 57. – P. 2777-2788.
  16. Pennacchia C., Ercolini D. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics // *Meat Science.* – 2004. – V. 67, № 2. – P. 309-317.
  17. Posta P., Costa D. Detection of antimicrobial activities and bacteriacin structural genes in faecal enterococci of wild animals // *Microbiol. Research.* – 2007. – V. 162, № 3. – P. 257-263
  18. Pot B., Tsakalidou E. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus* // *Lactobacillus molecular biology from genomics to probiotics.* – L.: Caister Academic Press, 2009. – P. 26-27.
  19. Rantsion K., Comi G., Cocalin L. The *rpoB* gene as a target for PSR – DGGE analysis to follow lactic acid Bacteriol population dynamics during food fermentations // *Food Microbiol.* – 2004. – V. 21. – P. – 481-487.
  20. Saavedra L., Taranto M. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains // *Inter. J. Food Microbiol.* – 2003, V. 88, № 2. – P. 241-245.
  21. Stackebrandt E., Frederikson W., Garrity G.M. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52. – P. 1043-1047.
  22. Vizoso Pinto M., Franz C. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products // *Inter. J. Food Microbiol.* – 2006. V.109, № 3. – P. 205-214.