

Н.М. Шабанова ¹, Ю.П. Джиноев ^{1, 2}, Е.В. Бухарова ¹, С.М. Попкова ¹, Е.В. Кочерыгина ³,
Е.Б. Ракова ^{1, 2}, О.В. Ерофеева ³, М.В. Лесничая ⁴, С.В. Кузнецов ⁴, Б.Г. Сухов ⁴

ВИДОВАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РОСТА ЛАКТОБАЦИЛЛ ИЗ ВАГИНАЛЬНОГО БИОТОПА НА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ С ВКЛЮЧЕНИЯМИ РАЗНЫХ ТИПОВ ПРИРОДНЫХ НАНОПОЛИСАХАРИДОВ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

³ Иркутский государственный университет (Иркутск)

⁴ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)

В данной работе представлено исследование по изучению субстратных и пребиотических свойств природных нанополисахаридов для ряда видов лактобактерий, выделенных из вагинального биотопа женщин, с оценкой их видовых комбинаций. Большинство типизируемых видов лактобактерий предпочитают расти на средах с полисахаридами, в основном в питательном бульоне с добавлением галактоманна и каррагинана. Использование галактоманна способствует увеличению показателя частоты выявляемости, по сравнению с выделением с первичного материала, приблизительно в 2 раза.

Ключевые слова: лактобациллы, нанополисахариды, пребиотик, ПЦР

SPECIES SUBSTRATE SPECIFICITY OF GROWTH OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM VAGINAL BIOTOPE ON CULTURE MEDIUM WITH INCLUSIONS OF DIFFERENT TYPES OF NATURAL NANOPOLYSACCHARIDES

N.M. Shabanova ¹, Yu.P. Dzhioev ^{1, 2}, E.V. Bukharova ¹, S.M. Popkova ¹, E.V. Kocherygina ³,
E.B. Rakova ^{1, 2}, O.V. Erofeeva ³, M.V. Lesnichaya ⁴, S.V. Kuznetsov ⁴, B.G. Sukhov ⁴

¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

³ Irkutsk State University, Irkutsk

⁴ A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk

The article presents the research of substrate and prebiotic properties of natural nanopolysaccharides for several species of lactobacilli isolated from vaginal biotope of women, with assessment of their species combinations. Most of typeable lactobacilli species prefer to grow on media containing polysaccharides, mainly in nutrient broth supplemented with galactomannan and carageenan. Using galactomannan increases the frequency of detection, as compared with the isolation from the starting material, twice.

Key words: lactobacilli, nanopolysaccharides, prebiotic, PCR

Современные технологии в области создания продуктов функционального питания в своей основе используют разработки в смежных областях научных дисциплин. Так, для создания пребиотических продуктов используются результаты исследований в молекулярной микробиологии, медицине, нутригеномике, экологии продуктов питания. Здесь основой пребиотического продукта являются живые микроорганизмы индигенной микрофлоры человека. Та же самая междисциплинарная структура исследований характерна для разработки пребиотических продуктов, хотя здесь больший акцент делается на исследования в области создания ингредиентов на основе химических и биологических особенностей их структур, позволяющих им быть устойчивым к расщепляющим ферментам и стимулировать рост и жизнедеятельность полезной микрофлоры. Более сложным функциональным продуктом являются синбиотики. Синбиотик – это функциональный пищевой компонент растительного, животного или микробиологического происхождения, представляющий собой комбинацию пробиотиков и пребиотиков, оказывающих синергический эффект на физиологические функции и метаболизм человека в

целом [4]. За счет такого взаимодействия не только наиболее эффективно имплантируются вводимые микроорганизмы – пробиотики в кишечные и вагинальные биотопы хозяина, – но и стимулируется его собственная микрофлора. В результате этого нормализуются обменные процессы в организме человека [2]. Микрофлоры биотопов организма человека формируют местный и системный иммунитет, участвуют в процессах жирового и пигментного обмена, а также в выработке пищеварительных ферментов, эндогенном синтезе витаминов и субстанций, оказывающих бактерицидное действие на болезнетворные микроорганизмы [5, 8].

Наиболее эффективными пребиотиками являются олиго- и полисахариды, содержащие β-гликозидные связи, которые легко гидролизуются в биотопах ферментами микрофлоры с освобождением моносахаров и их последующей биоутилизацией этой микрофлорой [6, 7].

Исходя из этого, целью данной работы являлось проведение экспериментальных исследований по изучению субстратных и пребиотических свойств природных нанополисахаридов (арабиногалактана, галактоманна, каррагинана) для ряда видов

лактобактерий, выделенных из вагинального биотопа женщин, с оценкой их видовых комбинаций при культивировании на средах с разными типами используемых полисахаридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании было использовано 16 бактериальных образцов лактобацилл, полученных из вагинальных смывов от женщин репродуктивного возраста, проходивших обследование в Научном центре проблем здоровья семьи и репродукции человека. Бактериологическое исследование проводилось в соответствии с общепринятыми методиками [1]. В работе в качестве включений в культуральные среды использовались природные полисахариды, приготовленные и полученные в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского: арабиногалактан в двух композитных формах – очищенный от примесей и неочищенный, каррагинан и галактоманнан. Биомасса бактерий была выращена на шести видах жидких сред: мясо-пептонном бульоне (МПБ), МПБ с глюкозой, МПБ с очищенным арабиногалактаном, МПБ с неочищенным арабиногалактаном, МПБ с добавлением каррагинана и на МПБ с добавлением галактоманнана. Концентрация полисахаридов в культуральных средах составляла 0,4 %.

Для выделения ДНК бактерий из культуральной среды использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). В качестве мишеней для генотипирования был выбран информационный ген 16S рРНК лактобацилл. Типирование проводили с 5 парами праймеров, специфичными для соответствующих видов лактобацилл [3]. Для ПЦР-амплификации использовали коммерческий набор AmpliSens-200-1 (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Реакция амплификации для всех 5 пар праймеров была модифицирована, оптимизирована

и проходила по следующей схеме: первичная денатурация ДНК – при 95 °С в течение 2 мин, далее 35 циклов амплификации при условиях: 95 °С в течение 1 мин, 56 °С в течение 1 мин, 72 °С в течение 1 мин и заключительная элонгация – 72 °С в течение 3 мин. Электрофорез ПЦР-фрагментов ДНК лактобацилл проводили с использованием 1,0%-го агарозного геля в 1-кратном трис-ацетатном буфере. Размеры амплифицированных фрагментов идентифицировали в соответствии с протоколом стандартных маркеров молекулярной массы ДНК («Fermentas», Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов генетического типирования видов лактобацилл свидетельствует о том, что используемые видоспецифичные праймеры достаточно четко разделяют соответствующие виды лактобацилл в общей массе микроорганизмов вагинального биотопа (рис. 1), что свидетельствует как об их высокой видоспецифичности, так и о технической и информационной достоверности полученных результатов.

В различных образцах изначально присутствовали разные виды лактобацилл. В дальнейшем, после проведения ПЦР-анализа, определялись те или иные виды лактобацилл в шести различных средах: голодном мясопептонном бульоне (МПБ), МПБ с очищенным арабиногалактаном, МПБ с неочищенным арабиногалактаном, МПБ с каррагинаном и МПБ с галактоманнаном.

Первичное определение видов лактобацилл в материале из соскобов вагинального биотопа показало неполное наличие всех пяти видов, и степень разнообразия видовых сочетаний выявленных видов лактобацилл была большей. Ни в одном образце не был зафиксирован полный набор исследуемых видов. Максимальное количество видов (3 вида) было выявлено только в 18,7 % случаев, причем сочетания видов различались. По наличию отдельных видов

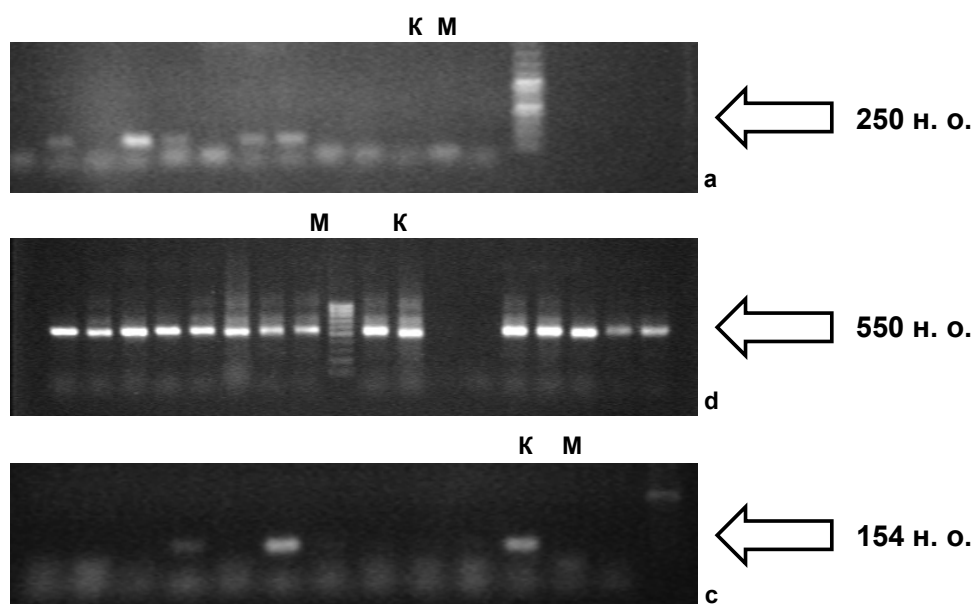


Рис. 1. Образцы электрофореграмм результатов ПЦР-анализа с видовыми праймерами на 16S rRNA: а – *L. jensoni* ~ 250 нуклеотидных оснований (н. о.); d – *L. plantarum* ~ 550 н. о.; c – *L. crispatus* ~ 154 н. о.; М – маркер длины ДНК фрагментов; К – отрицательный контроль.

доминировал *L. crispatus* (81,2 %), далее – *L. plantarum* (31,2 %) и *L. gasseri* (25 %). Другие виды фиксировались в единичных случаях.

Количественный анализ видов лактобацилл, выращенных на разных вариантах питательных сред, показал, что наиболее предпочтительным для лактобацилл в качестве субстрата является галактоманнан.

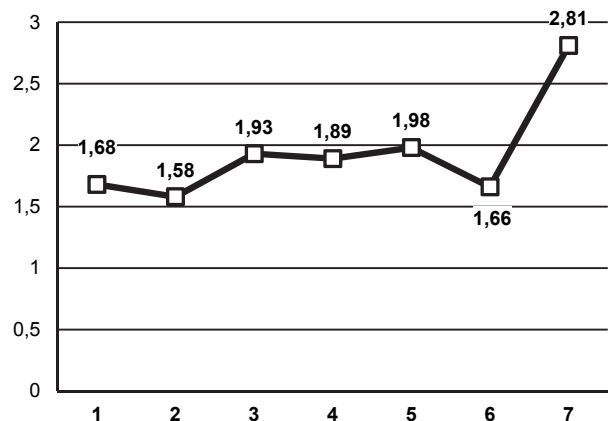


Рис. 2. Среднее количество видов лактобацилл, выращенных на различных вариантах питательных сред: 1 – первичный материал; 2 – МПБ (голодная среда); 3 – МПБ с глюкозой; 4 – МПБ с очищенным арабиногалактаном; 5 – МПБ с неочищенным арабиногалактаном; 6 – МПБ с каррагинаном; 7 – МПБ с галактоманнаном.

Среднее количество видов лактобацилл, культивируемых на питательной среде с добавлением галактоманнана, составляет 2,81 (рис. 2), в то время как на голодной среде (без сахаров) оно оказалось минимальным и составило 1,58. На питательных бульонах с добавлением очищенного и неочищенного арабиногалактана среднее количество видов составило 1,89 и 1,98 соответственно, тогда как среднее количество видов лактобацилл, выращенных на питательном бульоне с каррагинаном, оказалось ниже, чем на других полисахаридах, и ниже, чем количество видов, выделенных с первичного материала (1,66 и 1,68 соответственно).

Рассматривая видовую структуру лактобацилл (рис. 3) в отдельных образцах, можно заметить, что вид (виды), выявленный в первичном материале, не всегда выделялся на разных средах. В ряде случаев виды лактобацилл, не обнаруженные в первичном материале определялись в нескольких средах с полисахаридами и даже в голодной среде. Примечательно, что вид *L. plantarum*, обнаруженный в первичном материале только в 31 % случаев, на других вариантах сред стал определяться значительно чаще. Так, например, на питательном бульоне с добавлением галактоманнана частота встречаемости *L. plantarum* возросла в 2 (62 %) раза, по сравнению с первичным материалом. Вид *L. crispatus*, имея преимущественный рост в первичном материале, по сравнению с другими видами, по частоте выявляемости также варьировал на других вариантах сред. Частота выделения *L. crispatus* в первичном материале составила 81 % случаев, тогда как после культивирования на голодном бульоне (МПБ) этот показатель снизился до 37 %. Наиболее часто *L. crispatus* выявлялся после культивирования на бульоне с добавлением очищенного арабиногалактана и галактоманнана (94 % и 87 % соответственно). При сравнении показателей частоты встречаемости *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensoni* наблюдалась схожая картина. Использование галактоманнана способствует увеличению показателя частоты выявляемости, по сравнению с выделением с первичного материала, приблизительно в 2 раза, что свидетельствует о способности данного полисахарида стимулировать рост лактобацилл и о возможности его использования в составе синбиотических продуктов.

ВЫВОДЫ

Структура вагинальных микробиоценозов, типизируемых по пяти видам лактобактерий, имеет индивидуальные различия по количественным и качественным параметрам их сочетаний.

В микробиологическом аспекте большинство типизируемых видов лактобактерий предпочитают расти на средах с полисахаридами, в основном в МПБ с галактоманнаном и каррагинаном.

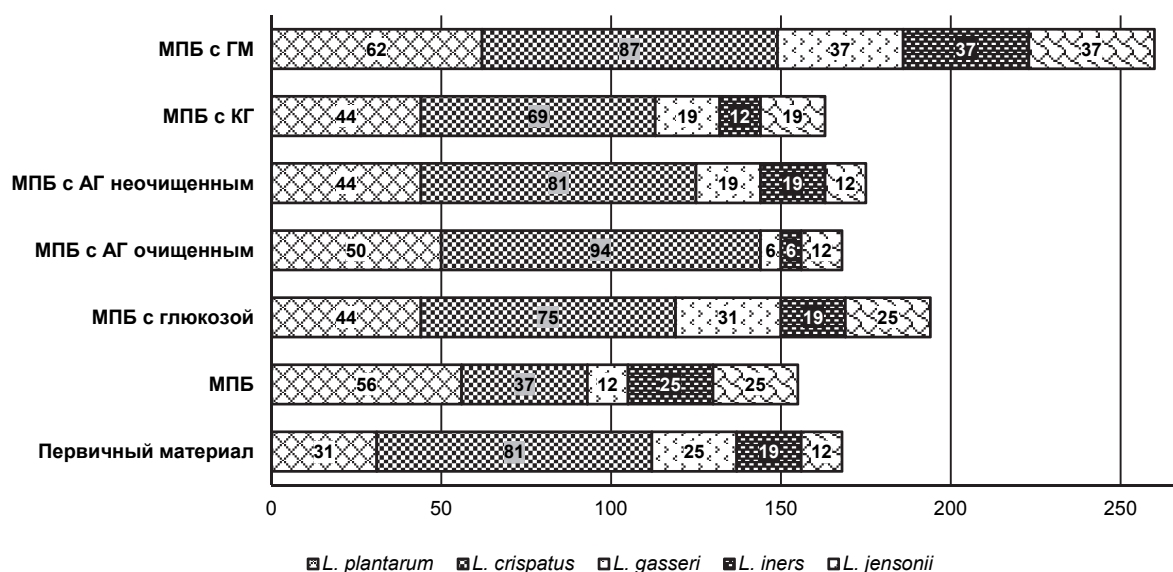


Рис. 3. Видовая структура лактобацилл, выделенных с различных вариантов питательных сред.

В исследуемой выборке представлены все 5 определяемых видов лактобацилл. В качестве доминирующих видов определены *L. crispatus* и *L. plantarum* как в первичном материале, так и на всех вариантах питательных сред, причём более чем в половине образцов (56 %) лактобациллы были представлены только одним видом, и только в 25 % образцов лактобациллы были обнаружены в виде трехвидовых ассоциаций.

Лактобактерии, не зафиксированные в первичном посеве, выявлялись в дальнейшем на других средах с полисахаридами (арабиногалактаном, каррагинаном, галактоманнаном) в той или иной степени количественного и качественного разнообразия.

Впервые выявлено, что используемые полисахариды (в основном галактоманнан с нанокмппозитными включениями) являются усилителями ростовых свойств для разных видов лактобацилл, что имеет важное значение для его использования в качестве пребиотика, а также в составе синбиотических продуктов.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Айламазян Э.К. и др. Акушерство: Национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1200 с. Aylamazyan E.K. et al. Obstetrics: National Guidelines. – Moscow: GEOTAR-Media, 2007. – 1200 p. (in Russian)
2. Джиоев Ю.П. и др. Исследование молекулярно-генетических методов для типирования бифидобактерий и анализ видов архитектуры кишечника у жителей промышленного города // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 68–74. Dzhioev Yu.P. et al. Research of molecular-genetic methods for typing of bifid bacteria and analysis of types of

architectonics of intestinal microbiocenosis in the population of industrial town // Izv. Irkut. gos. un-ta. Ser. Biologiya. Jekologiya. – 2009. – Vol. 2, N 2. – P. 68–74. (in Russian)

3. Самойлов А.В. Разработка технологии спрэдов функционального назначения с симбиотическим комплексом: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.18.06. – М., 2008. – 27 с.

Samoylov A.V. Development of the technology of spreads of functional purpose with symbiotic complex: abstract of dissertation of Candidate of Technical Sciences: 05.18.06. – Moscow, 2008. – 27 p. (in Russian)

4. Уварова Е.В., Султанова Ф.Ш. Влагище как микроэкосистема в норме и при воспалительных процессах гениталий различной этиологии // Гинекология: Журнал для практических врачей. – 2002. – № 4. – С. 89–95.

Uvarova E.V., Sultanova F.Sh. Vagina as a microecosystem in normal conditions and at inflammatory processes of genitals of different etiology // Ginekologiya: Zhurnal dlja prakticheskikh vrachej. – 2002. – N 4. – P. 89–95. (in Russian)

5. Gibson G.R., McCartney A.L., Rastall R.A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections // Br. J. Nutr. – 2005. – Vol. 93, N 1. – P. 31–34.

6. Panesar P.S., Kumari S., Panesar R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications // Crit. Rev. Biotech. – 2013. – Vol. 33 (4). – P. 345–364.

7. Swennen K., Courtin C.M., Delcour J.A. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties // Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. – 2006. – Vol. 46. – P. 459–471.

8. Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids // J. Clin. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 40. – P. 235–243.

Сведения об авторах

Шабанова Наталья Михайловна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: n.m.shabanova@mail.ru)

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Бухарова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Кочерыгина Елена Владимировна – сотрудник Иркутского государственного университета

Ракова Елена Борисовна – научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Ефремова Ольга Владимировна – сотрудник Иркутского государственного университета

Лесничая Марина Владимировна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории непредельных гетероатомных соединений Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Кузнецов Сергей Викторович – аспирант, лаборант лаборатории непредельных гетероатомных соединений Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Сухов Борис Геннадьевич – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории непредельных гетероатомных соединений Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Information about the authors

Shabanova Natalya Mikhaylovna – Junior Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str., 16, Irkutsk, 664003; tel.: +7 (3952) 33-34-41; e-mail: n.m.shabanova@mail.ru)

Dzhioev Yuri Pavlovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems

Bukharova Ekaterina Vladimirovna – Junior Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems

Popkova Sofia Markovna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems

Kocherygina Elena Vladimirovna – officer of Irkutsk State University

Rakova Elena Borisovna – Research Officer of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems

Erofeeva Olga Vladimirovna – officer of Irkutsk State University

Lesnichaya Marina Vladimirovna – Candidate of Chemical Sciences, Junior Research Officer of the Laboratory of Unsaturated Heteroatomic Compounds of A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS

Kuznetsov Sergey Viktorovich – Postgraduate, Research Assistant of the Laboratory of Unsaturated Heteroatomic Compounds of A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS

Sukhov Boris Gennadjevich – Candidate of Chemical Sciences, Leading Research Officer of the Laboratory of Unsaturated Heteroatomic Compounds of A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS