

Л. А. Ильина<sup>1</sup>, Е. А. Ёылдырым<sup>1</sup>, В. А. Филиппова<sup>1</sup>, И. Н. Никонов<sup>1,5</sup>, Г. Ю. Лаптев<sup>1</sup>,  
Н. И. Новикова<sup>1</sup>, В. И. Фисинин<sup>2</sup>, И. И. Чеботарев<sup>3</sup>, Н. Г. Машенцева<sup>4</sup>, Д. Л. Клабукова<sup>4</sup>

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА *Lactobacillus* *plantarum* L-211 МЕТОДОМ T-RFLP

Поступила в редакцию \*\*.\*\*.2015. Принята к печати \*\*.\*\*.2015.

В статье представлены результаты влияния пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* на бактериальное сообщество экскрементов белых мышей, полученные с использованием молекулярно-генетического метода T-RFLP. Показано, что внутрибрюшинное введение пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* L-211 оказало положительное действие на состав микробиома экскрементов мышей и вызвало достоверное увеличение представителей нормофлоры: родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*. При этом отмечено статистически значимое снижение содержания микроорганизмов, традиционно связанных с дисбиозом желудочно-кишечного тракта человека и животных: бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, включая представителей рода *Salmonella*, семейства *Actinobacteriaceae* и рода *Helicobacter*.

**Ключевые слова:** белые мыши, микрофлора экскрементов, *Lactobacillus plantarum*, T-RFLP-анализ, молекулярно-генетические исследования.

В настоящее время применение пробиотических биопрепаратов на основе штаммов полезных микроорганизмов, продуцирующих аминокислоты и другие жизненно необходимые вещества, является одним из подходов для профилактики и терапии заболеваний человека и животных [1 – 3]. Фундаментальный научный интерес представляет исследование влияния таких препаратов на состав микробиома кишечника, так как известно, что нормальная кишечная микрофлора способна оказывать воздействие на формирование иммунной системы организма-хозяина, участвовать в инактивации некоторых вредных продуктов распада и препятствовать размножению условно-патогенных бактерий [4, 5]. Классическим модельным объектом для исследования влияния пробиотических препаратов на состав микробиома кишеч-

ника в модельных экспериментах являются лабораторные животные — мыши.

Ряд исследователей продемонстрировали, что положительный эффект от пробиотических штаммов связан с их способностью занимать свободные экологические ниши в кишечнике и продуцировать ряд БАВ [5, 6].

Перспективными объектами для создания пробиотических препаратов являются бактерии рода *Lactobacillus*. Подавляющее число данных микроорганизмов синтезируют органические кислоты и бактериоцины, в связи с чем имеют способность к антагонистическому вытеснению из кишечника патогенов, включая *сальмонеллы*, *протеи*, *стафилококки*, *кишечную палочку*, *псевдомонады*, *стрептококки* [7, 8].

Несмотря на широкий интерес к представленной теме, вопрос воздействия лактобактерий на состояние микробиоценоза кишечника до сих пор изучен не в полной мере. Это объясняется, прежде всего, практически полным отсутствием методической базы для исследования факультативно и строго анаэробных микроорганизмов, населяющих пищеварительный тракт. В связи с этим согласно традиционным представлениям, сложившимся на основе классических методов микробиологии, основу сообщества экскрементов мышей составляют бактериоиды, бифидобактерии, эубактерии, пептококки, клостридии, лактобактерии, стрептококки, стафилококки, энтерококки [9]. Достижения био-

<sup>1</sup> ООО «БИОТРОФ+», 196602 Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, 8.

<sup>2</sup> ВНИИ Научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 141311 Московская область, г. Сергиев Посад, ул. Птицеградская, 10.

<sup>3</sup> ООО «Биореактор», 114142, Московская обл., г. Щелково, ул. Комарова, 18.

<sup>4</sup> ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет пищевых производств», 125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11.

<sup>5</sup> nikonov@biotrof.ru

логии XXI в. и, прежде всего, возможность исследования микробиома кишечника с использованием молекулярно-генетических подходов на основе гена 16S рРНК, которые позволяют изучать разнообразие микроорганизмов, минуя стадию их культивирования [10, 11], привели к пониманию необходимости пересмотра классических представлений. Показано, что использование современных молекулярно-генетических методов, например, T-RFLP-анализа (terminal restriction fragment length polymorphism), позволяет дать развернутую характеристику микробного сообщества, выявляя не только таксономические доминанты, но и минорные компоненты, в том числе некультивируемые микроорганизмы, доля которых в разных экосистемах может достигать 90 % [12, 13]. Однако исследования кишечного микробиома мышей методом T-RFLP до настоящего времени единичны и посвящены исследованию отдельных микроорганизмов [14, 15], тогда как сведения о комплексном анализе метагенома, а также воздействии на него пробиотических штаммов лактобактерий отсутствуют.

Цель работы — изучение пробиотической активности штамма *L. plantarum* L-211 с использованием молекулярно-генетического метода T-RFLP.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние пробиотической культуры *L. plantarum* L-211 на состав бактериального сообщества экскрементов исследовали на 20 белых мышках SHK-линии обоего пола в ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора. Время проведения эксперимента — с 17 по 30 июня 2015 г. Животные доставлены из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, имели сертификат № 03639 от 24.05.2015 г. до 11.07.2015 г. и ветеринарное свидетельство 250 № 070833 от 24.05.2015 г. Перед отправкой из филиала мыши находились на карантине 21 день.

Для исследования отобрали клинически здоровых белых мышей с нормальной окраской слизистых оболочек и оформленным стулом. Средняя масса животных составляла  $13,5 \pm 1,0$  г. Сформировали 2 группы по 10 животных в каждой, включая контрольную и экспериментальную (с применением штамма *L. plantarum* L-211). Группы животных формировали по массе тела и возрасту. Животных содержали в виварии согласно СП 2.2.1.3218–14 и правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных [16]. Все время исследований

животные получали брикетированный корм производства ООО «Лабораторкорм» (Россия). Комбикорм, предназначенный для лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков), имеет сертификат соответствия № РОСС RU. ПР 98 Д00497 до 07.02.2016 г. Корм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов.

Клетки пробиотического штамма вводили животным опытной группы внутрибрюшинно в концентрации  $10^{10}$  микробных клеток в объеме 0,5 мл; контрольной группе вводили внутрибрюшинно физиологический раствор серии С080812 (годен до 09.2017) по 0,5 мл.

Для молекулярно-генетических исследований экскременты от 3 мышей из каждой группы отбирали на 14-е сутки эксперимента с соблюдением условий стерильности.

Состав бактериального сообщества экскрементов белых мышей анализировали в молекулярно-генетической лаборатории ООО «БИОТРОФ+» методом T-RFLP.

Общую ДНК из образцов выделяли с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas, Inc.», Литва) согласно рекомендациям производителя. ПЦР-амплификацию проводили с использованием ДНК-амплификатора Verity («Life Technologies, Inc.», США) с помощью зубактериальных праймеров: 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) с меткой на 5'-конце (флуорофор D4 — WellRed) и 1492R (TACGGHTACSTTGTACGACTT).

Флуоресцентно меченые ампликоны гена 16S рРНК очищали по стандартной методике [17]. Рестриктию 30 – 50 нг ампликонов 16S рРНК проводили рестриктазами *Hae*III, *Hha*I и *Msp*I, следуя рекомендации изготовителя («Fermentas», Литва). Продукты рестрикции анализировали с помощью SEQ 8000 («Beckman Coulter», США) согласно рекомендациям производителя. Принадлежность бактерий к определенной филогенетической группе определяли с использованием программы Fragment Sorter (<http://www.oardc.ohiostate.edu/trflpfragsort/index.php>).

Математическую и статистическую обработку экспериментальных результатов проводили с использованием программного обеспечения Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты молекулярно-генетических исследований с использованием T-RFLP-анализа показали, что структура микробиоценоза экскрементов мышей вопреки традиционным пред-

ставлениям [9] характеризовалась достаточно богатым таксономическим разнообразием как у мышей контрольной группы —  $54,00 \pm 1,5$  фило-типов, так и у опытной —  $42,00 \pm 4,0$  фило-типов (табл. 1).

При таксономическом анализе бактериального сообщества экскрементов значительную долю последовательностей ДНК не удалось идентифицировать: в контрольной группе их содержание составляло  $22,74 \pm 1,03$  %, в опытной —  $13,11 \pm 0,62$  %. Присутствие неидентифицированных микроорганизмов неизвестной таксономической принадлежности в экскрементах мышей исследователи выявляли и ранее [18].

Состав идентифицированных микроорганизмов экскрементов отнесен к 4 филумам и включал в себя, главным образом, представителей филума *Firmicutes*, в том числе бактерий семейств *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridiaceae*. Полученные результаты несколько противоречат существующему мнению о том, что бактерии из семейств *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* до настоящего времени обнаруживали только в составе содержимого рубца жвачных животных [20]. Помимо этого, в более низких концентрациях в экскрементах мышей выявлены представители филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*.

Также в содержимом экскрементов мышей выявлены в невысоких количествах условно-патогенные и патогенные микроорганизмы: представители рода *Helicobacter* и семейства *Enterobacteriaceae* (включая бактерии рода *Salmonella*), а также семейства *Actinobacteriaceae*, которые традиционно считаются связанными с дисбиотическими нарушениями в ЖКТ. Присутствие данных микроорганизмов исследователи выявляли и ранее. Так, в монографии Тимошко [9] указано о выявлении с использованием традиционных методов микробиологии (высевом микроорганизмов на питательные среды) достаточно высокого содержания стафилококков в экскрементах мышей. Кроме того, исследования Лоне [20] продемонстрировали, что в кишечнике мышей присутствует *Campylobacter jejuni*, который так же, как и бактерии рода *Helicobacter*, является представителем семейства *Campylobacteriaceae*. Интересно отметить, что другие патогенные бактерии рода *Staphylococcus*, традиционно выявляемые в содержимом кишечника мышей, в экскрементах исследуемых животных обнаружены не были.

Показано, что внутрибрюшинное введение мышам клеток *L. plantarum* способствовало из-

менению качественного и количественного состава микробиоты экскрементов. Прежде всего отмечено трехкратное увеличение количества представителей рода *Lactobacillus*, что, вероятно, связано с хорошей приживаемостью и раз-

Таблица 1. Состав бактериального сообщества экскрементов мышей (в %)

Таксон	Группа	
	контрольная	опытная
Филум <i>Bacteroidetes</i>	$4,33 \pm 0,22$	$2,07 \pm 0,09^{**}$
Род <i>Prevotella</i>	$3,28 \pm 0,14$	$2,07 \pm 0,09^{**}$
Род <i>Pedobacter</i>	$1,05 \pm 0,04$	Н.п.д.о.
Филум <i>Firmicutes</i>	$63,35 \pm 2,14$	$80,14 \pm 3,98^{**}$
Класс <i>Clostridia</i>	$20,24 \pm 0,98$	$0,55 \pm 0,02^{**}$
Семейство <i>Lachnospiraceae</i>	$5,89 \pm 0,23$	$0,55 \pm 0,02^{**}$
Род <i>Lachnospira</i>	$1,22 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,02^{**}$
Род <i>Butyrivibrio</i>	$0,95 \pm 0,04$	Н.п.д.о.
Семейство <i>Clostridiaceae</i>	$7,58 \pm 0,32$	Н.п.д.о.
Род <i>Clostridium</i>	$7,58 \pm 0,32$	Н.п.д.о.
Семейство <i>Ruminococcaceae</i>	$6,77 \pm 0,31$	Н.п.д.о.
Род <i>Ruminococcus</i>	$6,77 \pm 0,31$	Н.п.д.о.
Класс <i>Bacilli</i>	$43,11 \pm 2,11$	$79,59 \pm 3,57^{**}$
Семейство <i>Bacillaceae</i>	$14,69 \pm 0,58$	$13,50 \pm 0,65$
Род <i>Alicyclobacillus</i>	Н.п.д.о.*	$4,79 \pm 0,19$
Род <i>Bacillus</i>	$6,96 \pm 0,28$	$8,04 \pm 0,38^{**}$
Род <i>Paenibacillus</i>	$7,73 \pm 0,34$	$0,67 \pm 0,03^{**}$
Семейство <i>Lactobacillaceae</i>	$28,42 \pm 1,24$	$66,09 \pm 2,98^{**}$
Род <i>Enterococcus</i>	$2,77 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,03^{**}$
Род <i>Lactobacillus</i>	$19,89 \pm 0,91$	$65,42 \pm 2,75^{**}$
Род <i>Lactococcus</i>	$5,76 \pm 0,26$	Н.п.д.о.
Филум <i>Actinobacteria</i>	$0,91 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,04^{**}$
Род <i>Bifidobacterium</i>	$0,47 \pm 0,02$	$1,32 \pm 0,04^{**}$
Семейство <i>Actinobacteriaceae</i>	$0,44 \pm 0,02$	Н.п.д.о.
Филум <i>Proteobacteria</i>	$7,86 \pm 0,26$	$3,36 \pm 0,15^{**}$
Род <i>Helicobacter</i>	$0,81 \pm 0,04$	Н.п.д.о.
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	$5,60 \pm 0,24$	$2,30 \pm 0,09^{**}$
Род <i>Salmonella</i>	$2,26 \pm 0,09$	$1,06 \pm 0,50^{**}$
Uncultured bacteria	$22,74 \pm 1,03$	$13,11 \pm 0,62^{**}$
Общее количество фило-типов	$54,00 \pm 1,5$	$42,00 \pm 4,0^{**}$

\* Ниже предела достоверного определения методом T-RFLP.

\*\* достоверно при  $p \leq 0,05$ .

множением интродуцированных лактобацилл в содержимом кишечника. Одновременно выявлено уменьшение содержания других представителей семейства *Lactobacillaceae* — родов *Enterococcus* и *Lactococcus*. Известно, что благодаря способности некоторых бактерий рода *Lactobacillus* к адгезии на стенках кишечника, позволяющей им колонизировать пищеварительный тракт, что показано в работе [7], данные микроорганизмы могут занимать свободные экологические ниши в микробиоме кишечного тракта, оказывая при этом пробиотический эффект. В результате применения штамма *L. plantarum* произошло увеличение в экскрементах мышей содержания представителей семейства *Bifidobacteriaceae* и рода *Bacillus* (в 2,9 и 1,2 раза соответственно), также способных благодаря синтезу органических кислот и бактериоцинов к конкурентному вытеснению патогенов [9].

Кроме того, применение пробиотического препарата привело к уменьшению содержания ниже предела достоверного определения методом T-RFLP условно-патогенных и патогенных бактерий семейства *Actinobacteriaceae* и рода *Helicobacter*, рода *Salmonella* — в 2,1 раза, а также других микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* — в 2,4 раза.

Показано, что введение штамма *L. plantarum* достоверно снижало содержание представителей филума *Bacteroidetes* (родов *Prevotella* и *Pedobacter*) и класса *Clostridia* (семейств *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* и *Clostridiaceae*).

Различие в составе микробиомов экскрементов мышей при применении *L. plantarum* подтверждается и результатами расчета индексов биоразнообразия (табл. 2). Установлено, что бактериальное сообщество экскрементов мышей опытной группы с применением пробиотического штамма *L. plantarum* характеризовалось наименьшей величиной индекса Шеннона ( $2,48 \pm 0,09$ ), что указывает на наибольшую определенность и однородность состава данного микробиоценоза. Кроме того, в этой группе выявлены и самые низкие значения показателя индекса доминирования Симпсона ( $0,77 \pm 0,03$ ),

Таблица 2. Индексы биоразнообразия бактериального сообщества экскрементов мышей

Индекс биоразнообразия	Контрольная группа	Опытная группа
Шеннона	$3,57 \pm 0,12$	$2,48 \pm 0,09^*$
Симпсона	$0,96 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,03^*$

\* Достоверно при  $p \leq 0,05$ .

что также свидетельствует о низком накоплении энтропии и определенной степени организации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что штамм *L. plantarum* L-211 обладает пробиотической активностью, оказывая положительное воздействие на состав бактериального сообщества экскрементов мышей; в результате внутрибрюшинного введения исследуемого штамма происходит достоверное увеличение представителей нормофлоры — родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* и снижение содержания микроорганизмов, традиционно связанных с дисбиозом кишечника человека и животных: бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, включая представителей рода *Salmonella*, семейства *Actinobacteriaceae* и рода *Helicobacter*.

Работа выполнена в рамках соглашения с Министерством образования и науки Российской Федерации о предоставлении субсидии от 05.06.2014 г. №14.579.21.0021.

## СПИСОК ССЫЛОК

1. Воробьев А. А., Лыкова Е. А. / Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999. № 6. С. 102 – 105.
2. Krauses R. Food, nutrition and diet therapy. — Philadelphia, 2000. — 1194 p.
3. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. — М.: Грантъ, 1998.
4. Чахава О. В. Гнотобиология. — М., 1972.
5. Малик Н. И., Панин А. Н. / Ветеринария. 2001. № 1. С. 27.
6. Guarner F., Malagelada J. R. / Lancet. 2003. V. 8. № 361 (9356). P. 512.
7. Kucan M., Gobin I., Markov K., Momcilovic J. D., Frece J. / Int. J. Sanit. Eng. Res. 2012. V. 6. № 1. P. 25 — 30.
8. Ouwehand A. C., Salminen S., Isolaury E. / Antonie Leewenhoek. 2002. № 82. P. 279 – 289.
9. Тимошко М. А. Микрофлора пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных. — Кишинев: Штиинца, 1990. С.161.
10. McCartney A. L. / Br. J. Nutr. 2010. V. 88. P. 29 – 37.
11. Kitts C. L. / Cur. Is. Intest. Microbiol 2001. V. 2. P. 17 – 25.
12. Dicksved J., Floistrup H., Bergstrom A., Rosenquist M., Pershagen G., Scheynius A., Roos S., Alm J. S., Engstrand L., Braun-Fahrlander C., von Mutius E., Jansson J. K. / Appl. Environ. Microbiol 2007. V. 73. P. 2284 – 2289.

13. Davis E., Rehberger J., King M., Brown D. C., Maxwell C. V., Rehberger T. / 11th Int. Symp. Digestive Physiology of Pigs. 2010. V. 133. P. 92 – 94.
14. Imaeda H., Fujimoto T., Takahashi K., Kasumi E., Fujiyama Y., Andoh A. / Digestion. 2012. V. 86 (3). P. 250 – 257.
15. Chen L., Teasdale M. T., Kaczmarczyk M. M., Freund G. G., Miller M. J. / J. Microbiol. Methods. 2012. V. 91(2). P. 262 – 268.
16. ETS 123. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 18.III.1986.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. 480 с.
18. Patrone V., Ferrari S., Lizier M., Lucchini F., Minuti A., Tondelli B., Trevisi E., Rossi F., and Callegari M. L. / Microbiology. 2012. P. V. 158. P. 983 – 992.
19. Lone A. G., Selinger L. B., Uwiera R. E., Xu Y., Inglis G. D. / Plos One. 2013. V. 8. № 9. P. 1 – 15.
20. Тараканов Б. В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. — М.: Научный мир, 2006. — 188 с.

## DETERMINATION OF THE PROBIOTIC ACTIVITY OF THE STRAIN *Lactobacillus plantarum* L-211 USING T-RFLP

L. A. Ilina<sup>1</sup>, E. A. Yildirim<sup>1</sup>, V. A. Filippova<sup>1</sup>, I. N. Nikonov<sup>1,5</sup>, G. U. Laptev<sup>1</sup>, N. I. Novikova<sup>1</sup>, V. I. Fisinin<sup>2</sup>, I. I. Chebotarev<sup>3</sup>, N. G. Mashentseva<sup>4</sup>, D. L. Klabukova<sup>4</sup>

<sup>1</sup> BIOTROPH+ Limited, 8, Malinovskaya ulitsa, Saint-Petersburg, Pushkin, 196602

<sup>2</sup> All Russia Poultry Research Technology Institute, 10, Ptitcegradskaya street, Sergiev Posad, Moscow Region, 141300

<sup>3</sup> Bioreaktor Limited, 18 Komarova ulitsa, Shelkovo Moskow region, 114142

<sup>4</sup> Moscow State University of Food Production, 11, Volokolamskoye shosse, Moscow, 125080

<sup>5</sup> nikonov@biotrof.ru

The article presents the results of the effect of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* on the white mice excrement bacterial community, obtained using molecular genetic technique T-RFLP. It is shown that intraperitoneal injection of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L-211 had a positive effect on the mice excrement microbiome composition and caused a significant increase of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*. A significant reduction of microorganisms traditionally associated with dysbiosis of the gastrointestinal tract of humans and animals, bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, including members of the genus *Salmonella*, *Actinobacteriaceae* family and genus *Helicobacter* was shown.

**Keywords:** white mouse, excrement microflora, *Lactobacillus plantarum*, T-RFLP-analysis, molecular genetic studies.