

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*

Работа завершена:

" 30 " 05 2018 г.



(А.С. Волкова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н., доцент

" 31 " 05 2018 г.



(Д.Р. Яруллина)

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

" 5 " 06 2018 г.



(О.Н. Ильинская)

Казань – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 Таксономия бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	6
1.2 Видовая идентификации лактобацилл	9
1.2.1 Фенотипический подход	9
1.2.2 Методы идентификации бактерий по генотипическим признакам	11
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Штаммы микроорганизмов и условия культивирования	16
2.2 Определение принадлежности бактерий к роду <i>Lactobacillus</i>	16
2.3 Видовая идентификация лактобацилл по спектру утилизируемых сахаров	18
2.4 Видовая идентификация лактобацилл методом MALDI-TOF масс-спектрометрии	18
2.5 Видовая идентификация лактобацилл по последовательности гена 16S рРНК	19
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1 Определение видовой принадлежности лактобацилл по ГОСТ и по спектру утилизируемых сахаров	22
3.2 Идентификация бактерий методом MALDI-TOF масс-спектрометрии	29
3.3 Идентификация лактобацилл по последовательности гена 16S рРНК	29
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	
4.1 Оценка эффективности традиционного и генотипического подходов для таксономической идентификации бактерий рода <i>Lactobacillus</i>	30
ВЫВОДЫ	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	34

РЕФЕРАТ

Важное практическое значение лактобацилл определяет потребность в их точной и быстрой видовой идентификации, которая, однако, осложнена многочисленным видовым составом и сходными фенотипическими характеристиками представителей разных видов. Цель работы: сравнительный анализ методов таксономической идентификации бактерий рода *Lactobacillus*.

В качестве объектов исследования использовали 15 штаммов лактобацилл с неизвестной видовой принадлежностью, выделенных нами из природных эконисш, кисломолочных продуктов и пробиотиков, и 5 коллекционных штаммов с известной видовой принадлежностью.

В ходе работы мы провели предварительную проверку принадлежности исследуемых штаммов к роду *Lactobacillus* по ГОСТ. Все исследуемые микроорганизмы окрашиваются по Граму положительно, спор не образуют, каталазаотрицательные, следовательно, могут быть отнесены к роду *Lactobacillus*.

Видовую идентификацию по спектру утилизируемых сахаров проводили с помощью коммерческих планшетных тест-систем. Результаты сравнивали с данными из Определителя бактерий Берджи. Сходство полученных данных с характеристиками из определителя варьирует от 65 до 100% для разных штаммов. Мы подтвердили, что анализ спектра утилизируемых субстратов не позволяет точно идентифицировать вид у многих лактобацилл. Так, ферментационный профиль у использованных в работе облигатно гетероферментативных видов *L. brevis*, *L. buchneri* и *L. hilgardii* практически идентичен, следовательно, определить представителей этих видов данным методом невозможно.

Далее с помощью MALDI BioTyper был проанализирован спектр рибосомных белков исследуемых лактобацилл и подтверждена видовая принадлежность коллекционных штаммов и для 15 штаммов с неизвестной видовой принадлежностью получен логарифмический показатель больше 2.

Затем мы выделили геномную ДНК, поставили ПЦР с универсальными праймерами 16S рРНК и провели секвенирование. По последовательности гена 16S рРНК для всех штаммов был получен процент сходства в 97-100% с типовыми штаммами из базы данных NCBI. Согласно полученным результатам, 6 штаммов исследуемых лактобацилл отнесены к виду *L. plantarum*, остальные 9 штаммов – *L. fermentum*. Также была подтверждена видовая принадлежность 5 коллекционных штаммов. При этом результаты видовой идентификации лактобацилл с помощью MALDI и по последовательности гена 16S рРНК совпали для 19 образцов из 20, что подтверждает надежность MALDI-TOF масс-спектрометрии в видовой идентификации лактобацилл. Также результаты фенотипического метода показали ограничения анализа спектра утилизируемых субстратов в видовой идентификации лактобацилл. Данный метод применим при дифференциации видов, относящихся к разным физиологическим группам. Так, штамм *L. plantarum* HF-B1 методом масс-спектрометрии был идентифицирован как *L. fermentum*, по 16S рРНК как *L. plantarum*. Анализ ферментационного профиля показал, что штамм относится к виду *L. plantarum*.

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Lactobacillus* – это грамположительные, микроаэрофильные, каталазоотрицательные палочковидные бактерии, не образующие спор. Лактобациллы – одна из широко распространенных в природе групп организмов. Они встречаются в различных экологических нишах, таких как растения, ферментированные и молочные продукты, силос, вода, почва, сточные воды, организм человека и животных [Джобулаева с соавт., 2014].

В процессе жизнедеятельности лактобациллы синтезируют различные биологически активные вещества: органические кислоты, ферменты и др. Однако наиболее характерным свойством является способность продуцировать вещества с антибиотической активностью (бактериоцины) [Каблова с соавт., 2015]. Это определяет их практическое использование в пищевой и сельскохозяйственной промышленности, а также в медицине.

В промышленности лактобациллы используются для ферментирования и получения молочных и хлебобулочных изделий, а также для консервирования фруктов и овощей [Nishida *et al.*, 2017]. Сельскохозяйственное значение бактерий заключается в получении кормов для животных (силоса) и уменьшении вредного влияния пестицидов на растения, в симбиозе с которыми они находятся [Trinder *et al.*, 2016].

Лактобациллы входят в состав нормальной микрофлоры человека и млекопитающих животных. Они населяют респираторный, желудочно-кишечный и урогенитальный тракты, продукты их метаболизма подавляют рост патогенных бактерий и грибов, таким образом, поддерживают здоровое состояние организма [Talarico *et al.*, 2017]. Бактерии рода *Lactobacillus* также применяются при создании пробиотических препаратов, используемых при лечении желудочно-кишечных расстройств, воспалительных процессов в половых органах и заболеваний полости рта [Singh *et al.*, 2017; Kobayashi *et al.*, 2017].

Несмотря на то, что лактобациллы являются частью нормальной микрофлоры человека, они могут вызывать оппортунистические инфекции [Goldstrain *et al.*, 2015]. Бактерии обнаруживаются при таких патологиях, как бактериемия, холецистит, зубной кариес, эндокардит и другие [Salminen *et al.*, 2006; Chery *et al.*, 2013; Callaway *et al.*, 2013; Kato *et al.*, 2016].

Таким образом, большое значение бактерий рода *Lactobacillus* в научном и биотехнологическом плане диктует необходимость их быстрой и однозначной видовой идентификации. Сложность идентификации лактобацилл обусловлена их многочисленным видовым составом, а также тем, что представители разных видов часто обладают сходными фенотипическими и физиологическими характеристиками [Moraes *et al.*, 2013].

Целью данной работы является сравнительный анализ методов таксономической идентификации бактерий рода *Lactobacillus*.

В соответствии поставленной цели решаются следующие задачи:

- 1) Для 15 штаммов лактобацилл, выделенных из природных эконич, кисломолочных продуктов и пробиотиков, и 5 коллекционных штаммов провести предварительную проверку принадлежности к роду *Lactobacillus* по ГОСТ 10444.11-89: по отношению к окраске по Граму, наличию спорообразования и каталазы.

- 2) Выполнить видовую идентификацию лактобацилл на основе анализа спектра утилизируемых субстратов.

- 3) Провести видовую идентификацию лактобацилл методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

- 4) Выполнить видовую идентификацию лактобацилл по последовательности гена 16S рРНК.

ВЫВОДЫ

1) Для 15 штаммов лактобацилл, выделенных из природных экониш, кисломолочных продуктов и пробиотиков, выполнена родовая и видовая идентификация по ГОСТ 10444.11-89, с помощью MALDI Biotyper и по последовательности гена 16S рРНК.

2) Исследуемые лактобациллы отнесены к видам *L. fermentum* (9 штаммов) и *L. plantarum* (6 штаммов). Для референсных штаммов *L. fermentum* 90 TC-4, *L. brevis* DSM 20054, *L. brevis* ssp. *gravesensis* LMG 7934 (*L. hilgardii* ATCC 27305), *L. buchneri* DSM 20057, *L. rhamnosus* I2L подтверждена видовая принадлежность.

3) Результаты видовой идентификации лактобацилл с помощью MALDI Biotyper и по последовательности гена 16S рРНК совпали для 19 из 20 образцов, поэтому MALDI-TOF масс-спектрометрия может использоваться как быстрый и надежный метод видовой идентификации лактобацилл.

4) Показаны ограничения анализа спектра утилизируемых субстратов в видовой идентификации лактобацилл: ферментационный профиль позволил дифференцировать *L. fermentum/L. plantarum*, но не позволил дифференцировать *L. brevis/L. buchneri/L. hilgardii*.