

## ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной, <sup>2</sup>НПО «Микроген», Нижний Новгород

*Цель.* Подтверждение таксономического положения штамма *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 с использованием фенотипических (классический микробиологический, MALDI TOF масс-спектрометрия) и генетических (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК и полногеномное секвенирование) методов. *Материалы и методы.* Объект исследования — штаммы *L. fermentum* 90 TC-4 из различных коллекций. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью MALDI TOF масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CH<sub>L</sub> (Biomerieux, Франция), для выделения геномной ДНК использовали набор «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ, Москва). Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК проводили на секвенаторе GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter, США), полногеномное секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Сборка генома и биоинформационный анализ осуществляли с использованием программы BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)), «CLC Bio Assembly» и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>). *Результаты.* Установлено, что штамм *L. fermentum* 90 TC-4 в ряде случаев загрязнен культурой *L. plantarum*. В результате идентификации чистой культуры штамма *L. fermentum* 90 TC-4 с использованием спектра высокотехнологичных методов доказано, что данный штамм относится к виду *L. fermentum*. *Заключение.* Подтвержден таксономический статус штамма *L. fermentum* 90 TC-4.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 16—23

Ключевые слова: *Lactobacillus fermentum*, пробиотические штаммы лактобацилл, MALDI TOF масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование

А.Г.Точилина<sup>1</sup>, И.В.Белова<sup>1</sup>, И.В.Соловьева<sup>1</sup>, И.С.Горлова<sup>2</sup>, Т.П.Иванова<sup>1</sup>, В.А.Жирнов<sup>1</sup>

## CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC PROPERTIES OF *LACTOBACILLUS FERMENTUM* 90 TC-4 PROBIOTIC STRAIN

<sup>1</sup>Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>«Microgen», Nizhny Novgorod, Russia

*Aim.* Confirmation of taxonomic position of *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strain using phenotypic (classic microbiological, MALDI TOF mass-spectrometry) and genetic (16S rRNA gene segment sequencing and full genome sequencing) methods. *Materials and methods.* Object of the study — *Lactobacillus fermentum* 90 TC-4 strains from various collections. Mass-spectrometric analysis was carried out using Autoflex MALDI TOF mass-spectrometer (Bruker Daltonics, Germany), study of biochemical properties of the strain was carried out using API 50 CHL strips (Biomerieux, France), “DNA-sorb B” kit was used for isolation of genome DNA (CRIE, Moscow). Sequencing of the accumulated fragments of 16S rRNA gene was carried out using GenomeLab GeXP sequencing (Beckman Coulter, USA), full genome sequencing was carried out in MiSeq platform (Illumina). Assembly of genome and bioinformation analysis was carried out using BLAST program ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)), «CLC Bio Assembly» and genome server RAST ([rast.nmpdr.org](http://rast.nmpdr.org)). *Results.* *L. fermentum* 90 TC-4 strain was established to be contaminated by *L. plantarum* culture in a series of cases. As a result of identification of a pure culture of *L. fermentum* 90 TC-4 strain using a specter of high-technology methods, membership of the strain in *L. fermentum* species has been proven. *Conclusion.* Taxonomic status of *L. fermentum* 90 TC-4 strain was confirmed.

Key words: *Lactobacillus fermentum*, lactobacilli probiotic strains, MALDI TOF mass-spectrometry, full genome sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

В течение длительного времени в промышленной микробиологии для производства пробиотиков используют одни и те же штаммы рода *Lactobacillus*. Их свойства изучены, штаммы технологичны и позволяют получать большой выход биомассы. Тем не менее, при повторном изучении этих штаммов с использованием современных наукоемких методов, таких как ПЦР и секвенирование, могут быть получены результаты, ставящие под сомнение видовую принадлежность этих микроорганизмов. Так, на основе проведенных молекулярно-генетических исследований штамм *Lactobacillus fermentum* 90 ТС-4 был реклассифицирован и ему было присвоено новое название — *Lactobacillus plantarum* 90 ТС-4 [1—3]. Поскольку этот штамм успешно используется в биотехнологии при производстве пробиотиков с конца прошлого века и по настоящее время, установление его таксономического статуса является принципиальным вопросом, кроме того, в настоящее время точная идентификация штаммов-продуцентов пробиотиков с использованием молекулярно-генетических методов регламентирована соответствующими нормативными документами [4, 5].

*L. fermentum* 90 ТС-4 был выделен А.А. Ленцнером и Х.П. Ленцнер (Тартуский государственный университет, Эстония) от здорового человека. В результате изучения биологических свойств была установлена его принадлежность к виду *L. fermentum*. Штамм был передан в Нижегородский (тогда Горьковский) НИИЭМ в 1967 году. В 1969 году был разработан лабораторный регламент производства сухого лактобактерина, и в качестве штамма-продуцента был использован данный штамм.

Начиная с 1970 года на протяжении пяти лет этот штамм лиофильно высушивали в Горьковском НИИЭМ и Пермском институте вакцин и сывороток для передачи на хранение в ГИСК им. Л.А.Тарасевича. На настоящий момент штамм находится на хранении во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером № В-7582, в Научном Центре экспертизы средств медицинского назначения (ранее ГИСК им. Л.А.Тарасевича) — № 57, в Государственной коллекции нормальной микрофлоры МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, в Государственной коллекции лактобацилл Нижегородского НИИЭМ им. И.Н.Блохиной, в рабочих коллекциях маточных культур на филиалах НПО «Микроген».

С учетом новых данных о реклассификации *L. fermentum* 90 ТС-4 [1—3], актуальным является изучение свойств и установление таксономического статуса данного штамма, хранящегося в коллекциях, с использованием спектра фенотипических и генетических методов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — лиофильно высушенные штаммы *L. fermentum* 90 ТС-4 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения, Государственной коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной, заложенные на хранение в 1969, 1994, 2000, 2014 годах, а также из коллекции маточных культур НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио».

Лиофильно высушенные штаммы восстанавливали и готовили II генерацию

культуры с использованием среды MPC-1 (Lactobacillus MRS broth, HiMedia), среды MPC-4 (Lactobacillus MRS agar, HiMedia) и газогенерирующих пакетов GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator, США.

Выросшие колонии оценивали по морфологии, по 15 колоний каждого морфологического вида отбирали для следующего этапа исследования: образец из каждой колонии наносили на 3 ячейки мишени для последующей масс-спектрометрии и остаток засеивали в MPC-1 для последующей биохимической идентификации. Для биохимической идентификации отбирали культуры, по результатам масс-спектрометрии имевшие значения Score 2,100 и более, для проведения секвенирования гена 16S рРНК было отобрано по три чистые культуры штамма с типичным биохимическим профилем и наиболее высокими значениями Score. В работу по полногеномному секвенированию отбирали культуру штамма с подтвержденным по MALDI TOF и секвенированию 16S рРНК таксономическим статусом, типичным для вида биохимическим профилем, имеющую максимально высокий Score.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), внешнюю калибровку проводили с применением бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия), в качестве матрицы использовали  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричную кислоту (-CHCA). Для проведения MALDI масс-спектрометрического профилирования белков изучаемых штаммов проводили экстракцию с использованием муравьиной кислоты согласно руководству пользователя MALDI BioType, кластеризацию и анализ спектров проводили с использованием программ BioType OS, FlexAnalysis (Bruker). В качестве референс масс-спектров для кластерного анализа использовались масс-спектры лактобацилл из базы данных Bruker и масс-спектры штаммов из собственной базы данных НИИЭМ им. И.Н.Блохиной.

Расширенное изучение биохимических свойств штамма проводили с использованием стрипов API 50 CHL (Biomerieux, Франция), пробоподготовку, культивирование, идентификацию микроорганизмов и интерпретацию полученных результатов осуществляли согласно инструкциям производителя.

Для постановки ПЦР гена 16S рРНК геномную ДНК выделяли методом нуклеосорбции с использованием набора «ДНК-сорб В» (ЦНИИЭ, Москва), использовали стандартные реагенты производства ЦНИИЭ и специфические праймеры: FL 3'-gag ttt gat cct ggc tca gga-5', RL 3'-cga cga cca tga acc acc tgt-5' [8]. Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол» (Москва). ПЦР проводили на приборе «Терцик-МС2» («ДНК-технология», Москва).

Электрофорез продуктов амплификации выполняли в 1,5% агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромида этидия, в течение 40 мин при 100 V на гель в трис-боратном буферном растворе. Очистку амплифицированного фрагмента от агарозного геля для последующего секвенирования проводили с помощью набора для очистки ДНК (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Секвенирование наработанных фрагментов гена 16S рРНК выполняли с использованием секвенатора GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter). Полученные сиквенсы анализировали в программе BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) и MEGA [10].

Для проведения полногеномного секвенирования геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), подготовку библиотек проводили с использованием набора TrueSeq (Illumina Inc, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina), сборку генома и биоинформационный анализ осуществляли с использованием программного обеспечения «CLC bio assembly» и геномного сервера RAST (<http://rast.nmpdr.org>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При расसेве штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 на плотную питательную среду МРС-4 наблюдали серые звездчатые плоские шероховатые колонии диаметром 2 — 5 мм. В мазках отмечали полиморфные грамположительные палочки одинаковой толщины и разной длины — от кокков до длинных нитей, то есть морфология характерна для вида *L. fermentum*.

В ряде случаев наблюдали два вида колоний: белые блестящие выпуклые с ровными краями от 0,5 до 3 мм в диаметре и серые звездчатые плоские шероховатые диаметром 2 — 5 мм. В мазках клеток колоний первого типа наблюдали грамположительные бесспорные палочки средних размеров, равномерно окрашенные, расположенные поодиночке или в виде коротких цепочек — морфология культуры характерная для *L. plantarum*. В мазках колоний второго типа наблюдали полиморфные грамположительные палочки одинаковой толщины и разной длины — от кокков до длинных нитей, то есть морфология характерна для вида *L. fermentum*. Оба вида культуры были далее идентифицированы с использованием масс-спектрометрии и классического биохимического метода.

При MALDI TOF идентификации установлено, что культура, образующая серые шероховатые звездчатые колонии, относится к виду *L. fermentum*. Высокие значения Score values (от 1,922 до 2,217, категория А) достоверно подтверждают принадлежность культуры к данному виду. Культура, образующая белые блестящие выпуклые колонии, в свою очередь, идентифицирована как *L. plantarum*, значения Score values варьировали от 1,862 (категория В) до 2,091 (категория А). На рис. 1 показаны масс-спектры, характерные для *L. plantarum* и *L. fermentum* 90 TC-4, а также сопоставление полученных спектров с референсными спектрами из базы данных Bruker.

Таким образом, при восстановлении, рассева и идентификации штамма *L. fermentum* 90 TC-4 методом MALDI TOF масс-спектрометрии установлено, что в ряде случаев данный штамм был загрязнен культурой *L. plantarum*.

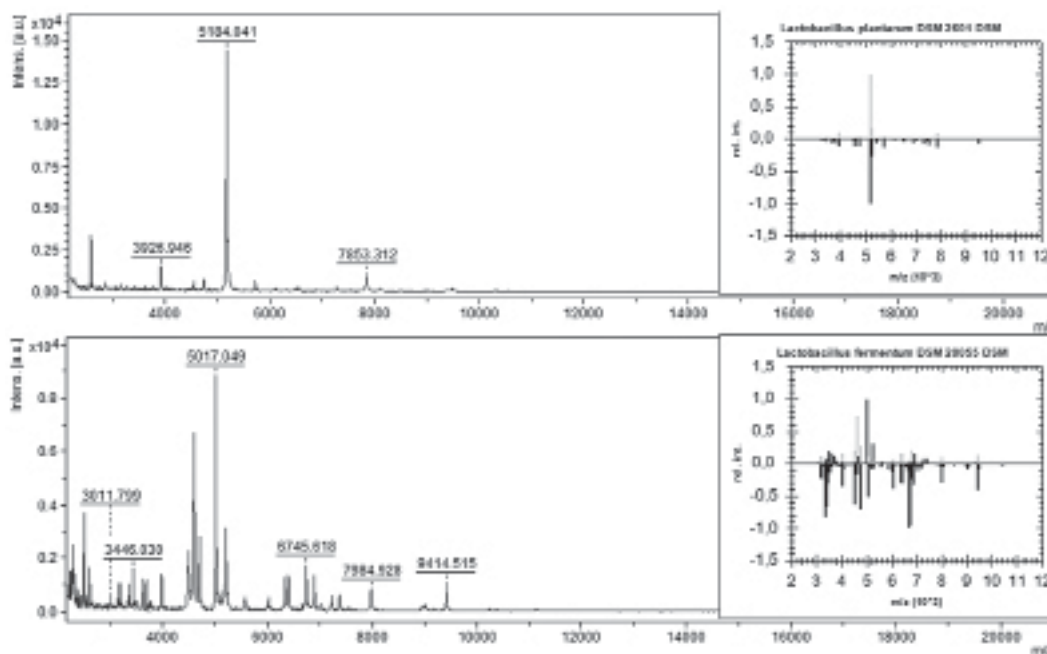


Рис. 1. MALDI масс-спектры экстрактов клеток штаммов *L. plantarum* и *L. fermentum* 90 TC-4 при использовании  $\alpha$ -CHCA матрицы.

На следующем этапе работы были получены и проанализированы индивидуальные масс-спектры и масс-листы чистых культур штамма *L. fermentum* 90 TC-4. Хотя снятие масс-спектров осуществляли в диапазоне 2000 — 20 000 m/z, визуально наиболее информативным является участок от 2000 до 10 000 m/z.

Метод MALDI масс-спектрометрии позволяет выявлять уникальный набор рибосомальных белков для каждого из исследуемых микроорганизмов. Принцип метода основан на измерении массы ионизированного вещества. При MALDI-ионизации образуются однозарядные ионы, т.е. один ион соответствует одному белку. В то же время, несколько белков могут иметь одинаковую массу и при масс-спектрометрии формировать один пик. При формировании масс-спектра полученные ионы выстраиваются в порядке возрастания масс, при этом интенсивность (высота) пиков не учитывается. При идентификации микроорганизмов учитывается весь набор пиков, а не отдельные пики.

Результаты белкового профилирования можно получить не только в графическом виде (масс-спектры), но и в табличном (масс-листы). При сравнении полученных масс можно выявить родовые, видовые и штаммовые особенности микроорганизмов — наличие в спектре белков определенной массы.

Сравнение и анализ масс-листов чистых культур штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 и референсных штаммов позволили установить, что для штамма *L. fermentum* 90 TC-4 характерен масс-спектр из 85 пиков, 75 из которых хорошо воспроизводимы, а специфичными являются следующие пики: 3373, 4535, 4562, 4638, 4655, 4979, 5051, 5167, 5179.

С использованием масс-спектров рибосомальных белков референсных штам-

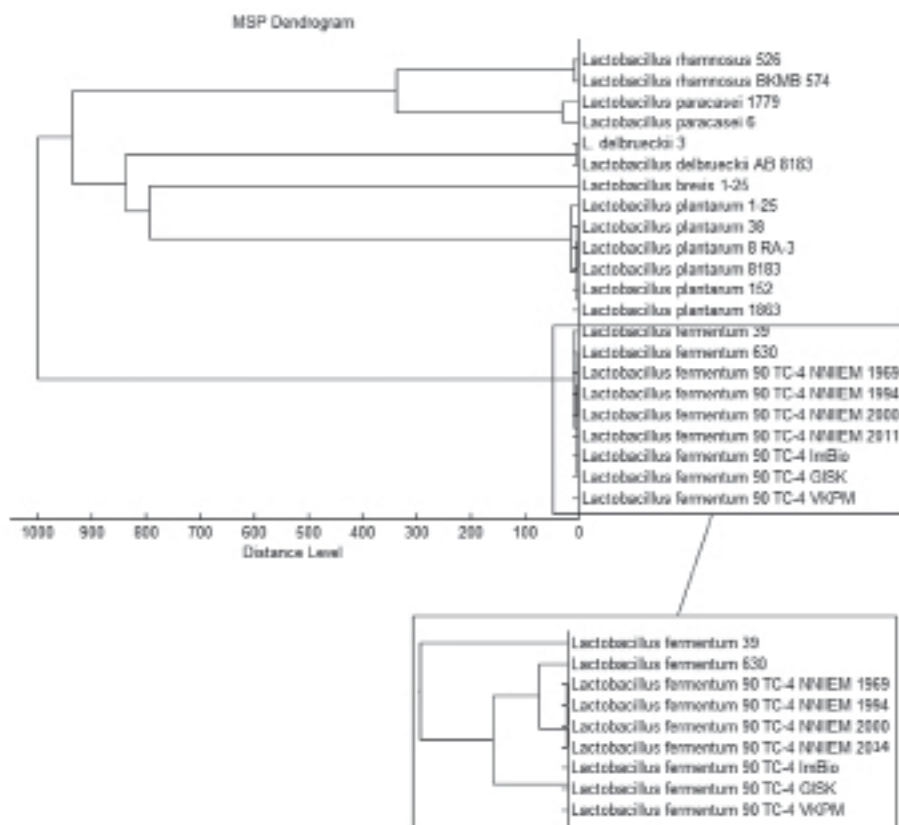


Рис. 2. Расположение штаммов *L. fermentum* 90 TC-4 среди штаммов рода *Lactobacillus* по результатам кластерного анализа MALDI масс-профилей.

мов из коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной была построена дендрограмма, иллюстрирующая видовую принадлежность штаммов *L. fermentum* 90 ТС-4 и их положение среди других штаммов рода *Lactobacillus* (рис. 2).

Кластерный анализ масс-профилей позволил отнести исследуемые штаммы в группу, соответствующую виду *L. fermentum*, что еще раз подтверждает его видовую принадлежность. Кроме того, культуры *L. fermentum* 90 ТС-4 из разных коллекций, а также этот штамм, заложенный на хранение в коллекцию НИИЭМ им. И.Н.Блохиной в разные годы (1969, 1994, 2000, 2014), составили единый кластер, что говорит о высокой степени родства данных культур и позволяет отнести их к одному штамму.

Для биохимической идентификации и изучения особенностей биохимического профиля штамма *L. fermentum* 90 ТС-4 было отобрано 10 культур штамма из разных коллекций, прошедших идентификацию с помощью масс-спектрометрии с наиболее высоким значением Score. Была изучена биохимическая активность штаммов с использованием стрипов API 50 CHL, содержащих контроль и 49 субстратов. Установлено, что все исследованные штаммы обладают характерным биохимическим профилем, который соответствует заявленному в паспорте штамма еще в 1969 году [7]: ферментируют галактозу, глюкозу, фруктозу, мальтозу, лактозу, мелибиозу и раффинозу, гидролизуют эскулин и глюконат калия.

Необходимо отметить, что виды *L. fermentum* и *L. plantarum* значительно отличаются по биохимическим свойствам: *L. plantarum* обладает более выраженной метаболической активностью, что обуславливает четкую дифференциацию этих двух видов.

Для дальнейшего изучения таксономического статуса штамма использовали метод ПЦР фрагмента гена 16S рРНК с его последующим секвенированием. Была проведена ПЦР чистых культур штамма с наработкой соответствующих фрагментов, которые затем были сконцентрированы в агарозном геле, выделены с использованием стандартного набора для выделения ДНК из геля. Затем проводилось секвенирование на приборе GenomeLab™ GeXP (Beckman Coulter).

Полученные сиквенсы были проанализированы в программе BLAST. Подтвержден таксономический статус штамма: совпадение нуклеотидных последовательностей указанной детерминанты штаммов *L. fermentum* 90 ТС-4

с наиболее близкой референсной последовательностью из GenBank *L. fermentum* IFO 3956 составило 98%.

С использованием полученных сиквенсов и референсных последовательностей в программе MEGA 6.0 была построена дендрограмма, отражающая их филогенетические связи. В качестве референса использовали последовательности генов 16S рРНК бактерий видов *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, находящихся в базе данных GenBank/EMBL. В результате построения иерархической структуры было показано, что все исследуемые варианты штамма входят в состав соответствующего видового кластера, что достоверно подтверждает его таксономическое положение. Необ-

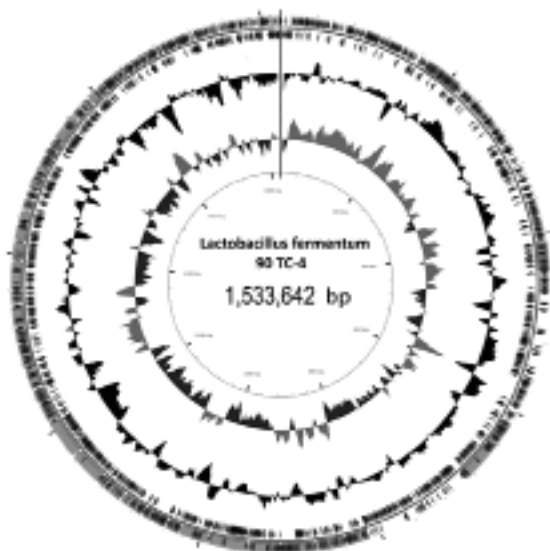


Рис. 3. Геномная карта штамма *L. fermentum* 90 ТС-4, построенная с использованием «CLC bio assembly».

ходимо отметить, что кластер *L. fermentum* далеко отстоит от группы, образованной штаммами вида *plantarum*.

В результате подтверждена идентичность всех исследованных культур *L. fermentum* 90 ТС-4 из вышеперечисленных коллекций с использованием фенотипических (MALDI TOF масс-спектрометрия, биохимическая идентификация) и генетического (секвенирование фрагмента гена 16S рРНК) методов.

На заключительном этапе работы было проведено полногеномное секвенирование штамма *L. fermentum* 90 ТС-4. Построена геномная карта штамма (рис. 3), установлены основные характеристики его генома.

Геном штамма представлен единственной кольцевой хромосомой. Размер генома составляет 1,533,642 пар нуклеотидов, содержание GC — 53,3%, характерное для данного вида [9]. По данным RAST (Rapid Annotation using Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org>) наиболее близкие к нашему изоляту штаммы относятся к виду *L. fermentum*: *L. fermentum* IFO 3956, *L. fermentum* 28-3-CHN, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. fermentum* CECT 5716.

Полученная геномная последовательность была проанализирована с использованием геномного сервера RAST, в ходе анализа была построена диаграмма, сектора которой соответствовали отдельным кластерам подсистем, представленным в геноме микроорганизма.

Установлено, что в геноме штамма представлено 283 подсистемы, распределенные по 22 крупным кластерам. Генетически детерминированы характерные для рода пути метаболизма углеводов (ферменты гликолиза и пентозофосфатного пути), метаболизма пирувата, моно-, ди- и олигосахаридов, сахароспиртов, механизмы устойчивости к стрессовым воздействиям и др.

В геноме представлены отдельные детерминанты антибиоткорезистентности — бета-лактамазы класса C, гены, детерминирующие устойчивость к тетрациклинам (EF-G — фактор трансляции элонгации G, Tet-like2 — защищающий рибосому протеин группы 2), молекулярные эффлюксные помпы, обуславливающие устойчивость в различных группах антибактериальных препаратов. Подтверждено отсутствие у данного штамма генов, кодирующих трансмиссивную антибиоткорезистентность (*ermC*, *tetO*, *Amp*, *hph*, *sh ble*), установлено, что генетические детерминанты антибиоткорезистентности расположены в геноме штаммов, не сопряжены с мобильными элементами, их горизонтальный перенос маловероятен. Можно рассматривать данный комплекс генов как проявление природной устойчивости данных штаммов к ряду антимикробных препаратов.

Обнаружено 9 детерминант, кодирующих отдельные частицы фагов (phage tail protein), ряд ферментов фага (phage terminase), белков, ответственных за компоновку его частиц. То есть, в геноме штамма содержится фаг в латентном состоянии (профаг), что характерно для большинства прокариот [6].

Показано, что геном штамма *L. fermentum* 90 ТС-4 не содержит детерминант, кодирующих токсины и суперантигены, свободен от генов патогенности (островков патогенности) и интегрированных плазмид.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ результатов исследования видовой принадлежности штамма *L. fermentum* 90 ТС-4, полученного из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, из коллекции Научного центра экспертизы средств медицинского назначения, Государственной коллекции лактобацилл НИИЭМ им. И.Н.Блохиной и из рабочей коллекции НПО «Микроген» в г. Нижний Новгород «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио» с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии, классического микробиологического метода, секвенирования участка гена 16S рРНК и полногеномного секвенирования показал, что в пере-

численных коллекциях сохранен искомый штамм, который имеет характерный для данного вида масс-профиль рибосомальных белков и биохимический профиль, соответствующий паспорту штамма.

Выявлено, что в ряде случаев штамм *L. fermentum* 90 ТС-4 загрязнен культурой *L. plantarum*, что и могло послужить причиной «подмены», так как при работе по лиофильному высушиванию и сохранению микроорганизма в коллекции отбирают типичные колонии в S-форме, подобные образуемым штаммом *L. plantarum*, в то время как штамм *L. fermentum* 90 ТС-4 образует колонии R-типа серого цвета, что является его отличительной особенностью.

Полногеномное секвенирование *L. fermentum* 90 ТС-4 позволило установить, что штамм обладает характерным для данного вида содержанием GC-оснований — 53,3 %, показано, что геном штамма содержит нетрансмиссивные гены антибиотикорезистентности, не содержит детерминант, кодирующих токсины и суперантигены, свободен от генов патогенности (островков патогенности) и интегрированных плазмид, что подтверждает возможность использования этого штамма в биотехнологии для производства пробиотиков.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ботина С.Г., Лысенко А.М., Суходолец В.В. Выяснение таксономического положения отечественных штаммов термофильных молочнокислых бактерий по данным секвенирования генов 16S рРНК. *Микробиология*. 2005, 74 (4): 448-452.
2. Ботина С.Г., Климина К.М., Коробан Н.В., Амерханова А.М., Зинченко В.В., Даниленко В.Н. Реклассификация отечественных пробиотических культур рода *Lactobacillus*. *Генетика*. 2010, 46 (11): 1485-1492.
3. Ботина С.Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии. Автореф. дис. д-ра биол. наук. М., 2011.
4. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. МУ № 2.3.2.2789-10. М., Роспотребнадзор, 2010.
5. Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. МУ № 4.2.2602-10. М., Роспотребнадзор, 2011.
6. Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013, 17 (4/2): 972-984.
7. Тарасова Н.Б. Сравнительное изучение лактобактерий и *E.coli* М-17 в целях разработки нового препарата — Лактобактерина. Дисс. д-ра мед. наук. Горький, 1969.
8. Chagnaud P. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Meth.* 2001, 44: 139-148.
9. Hammes W.P., Hertel C. The genus of *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Procaryotes*. 2006, 4: 320-340.
10. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28: 2731-273.

*Поступила 30.04.15*

Контактная информация: Точилина Анна Георгиевна, к.б.н.,  
603950, Нижний Новгород, ул. М. Ямская, 71, р.т. (831) 432-81-86



*М.В.Сычева*<sup>1,4</sup>, *А.С.Васильченко*<sup>1,3</sup>, *Е.А.Рогожин*<sup>2</sup>,  
*Т.М.Пашкова*<sup>1</sup>, *Л.П.Попова*<sup>1</sup>, *О.Л.Карташова*<sup>1</sup>

## **БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КУР**

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; <sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва; <sup>3</sup>Оренбургский государственный университет; <sup>4</sup>Оренбургский государственный аграрный университет

*Цель.* Выделение и изучение биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. *Материалы и методы.* В исследовании использовали пептиды из тромбоцитов кур, полученные методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Их антимикробную активность определяли методом микротитрования в бульоне; механизм биологического действия — с помощью метода флуоресцентной спектроскопии с использованием ДНК-тропных красителей. *Результаты.* Из тромбоцитов кур выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12. Установлено нарушение целостности барьерных структур микроорганизмов под воздействием тромбоцитарных антимикробных пептидов и преобладание клеток с поврежденной мембраной в популяции *E.coli*. *Заключение.* Полученные данные об антимикробной активности и механизме бактерицидного действия впервые выделенных фракций пептидов из тромбоцитов кур расширяют представление о функциональных свойствах тромбоцитов птиц и открывают перспективу для их дальнейшего изучения с целью использования в качестве антимикробного средства.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 24—29

Ключевые слова: антимикробные пептиды, тромбоциты, тромбоцитарный катионный белок, флуоресцентная спектроскопия, *Staphylococcus aureus* P209, *Escherichia coli* K12

*M.V.Sycheva*<sup>1,4</sup>, *A.S.Vasilchenko*<sup>1,3</sup>, *E.A.Rogozhin*<sup>2</sup>,  
*T.M.Pashkova*<sup>1</sup>, *L.P.Popova*<sup>1</sup>, *O.L.Kartashova*<sup>1</sup>

## **BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CHICKENS THROMBOCYTES**

<sup>1</sup>Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; <sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow; <sup>3</sup>Orenburg State University; <sup>4</sup>Orenburg State Agrarian University, Russia

*Aim.* Isolation and study of biological activity of antimicrobial peptides from chickens thrombocytes. *Materials and methods.* Peptides from chickens thrombocytes, obtained by reverse-phase high-performance liquid chromatography method with stepped and linear gradients of concentration increase of the organic solvent were used in the study. Their antimicrobial activity was determined by microtitration method in broth; mechanism of biological effect — by using fluorescent spectroscopy method with DNA-tropic dyes. *Results.* Individual fractions of peptides were isolated from chickens thrombocytes, that possess antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* P209 and *Escherichia coli* K12. A disruption of integrity of barrier structures of microorganisms under the effect of thrombocyte antimicrobial peptides and predominance of cells with damaged membrane in the population of *E. coli* was established. *Conclusion.* The data obtained on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal effect of the peptide fractions from chickens thrombocytes isolated for the first time expand the understanding of functional properties of chickens thrombocytes and open a perspective for their further study with the aim of use as antimicrobial means.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 24—29