

ВПЛИВ ПОЛІОЛІВ НА БАКТЕРІОТРОПНІ ВЛАСТИВОСТІ БЕЗКЛІТИННИХ СУПЕРНАТАНТІВ *LACTOBACILLUS REUTERI*

¹Книш О. В., ¹Мартинов А. В.,
²Войда Ю. В., ¹Бабич Є. М.

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України», м. Харків

²Харківська медична академія післядипломної
освіти, м. Харків

Гетероферментативні лактобактерії виду *Lactobacillus reuteri* ферментують вуглеводи з утворенням кінцевих продуктів з протимікробною активністю: вуглекислого газу, оцтової, молочної кислот та етанолу [1, 2]. Здатність *L. reuteri* продукувати такі протимікробні речовини і сполуки, як перекис водню, діацетил, реутерициклін (тетрамова кислота), реутерин 6 (бактеріоцин) та реутерин (3-гідроксипропіональдегід), залежить від генетичної «обдарованості» штаму та умов оточуючого середовища. Протимікробна активність реутерину *in vitro* достатньо досліджена [3]. Враховуючи нестійкість і потенційну токсичність через здатність зворотно дегідратуватися до токсичного акролеїну, *in vivo* ефекти реутерину ще належить вивчити. Продукція реутерину є результатом ферментації бактеріями триатомного спирту гліцерину і прикладом спрямованого прекурсором біосинтезу. Останній є одним з трьох видів комбінаторного біосинтезу, застосування якого вважають одним з перспективних підходів до пошуку нових потимікробних речовин та створення пробіотиків нового покоління [4].

Відсутність даних про використання інших спиртів як прекурсорів спонукає до проведення досліджень в даному напрямку. Підвищений інтерес до поліолів, перш за все, спричинений потенційною користю для здоров'я. Ксиліт, сорбіт і маніт знайшли широке застосування у харчовій, фармацевтичній, медичній та одонтологічній індустрії як цукрозамінники завдяки низькому рівню глікемічного індексу та протикарієсним властивостям.

Ксиліт (п'ятиатомний спирт, похідний ксилози) відомий здатністю пригнічувати ріст і адгезію карієсогенних мікроорганізмів, зокрема, *Streptococcus mutans*, стримувати утворення зубних бляшок та сприяти мінералізації емалі зубів [5, 6]. Карієсогенні мікроорганізми не ферментують ксиліт, тому при його вживанні не відбувається накопичення кислих продуктів ферментації, зниження рН бляшки і руйнування емалі кислотами. Завдяки пригніченню росту і адгезії *Streptococcus pneumoniae* та *Haemophilus influenzae* ксиліт знижує частоту гострих середніх отитів та респіраторних захворювань у дітей [6].

Сорбіт (шестиатомний спирт, похідний глюкози) в експериментах *in vivo* продемонстрував значний вплив на співвідношення в кишечнику грамнегативних і грампозитивних бактерій в бік збільшення як частки, так і активності останніх [7]. Вживання сорбіту супроводжувалося збільшенням

кількості лактобактерій, зокрема, *L. reuteri*, та підвищенням вмісту масляної кислоти, яка є джерелом енергії для клітин кишечника та має протиракову активність. Сорбіт використовують як прекурсор для промислового виробництва L-аскорбінової кислоти [8].

Маніт (шестиатомний спирт, похідний фруктози) є ізомером сорбіту, відрізняється розташуванням гідроксильних груп відносно атомів вуглецю. Завдяки осмотичній активності розчин маніту застосовується як протинабряковий, діуретичний засіб. Деякі штами *L. reuteri* за певних умов здатні синтезувати маніт з фруктози [8, 9, 10].

Бактерії відрізняються між собою за метаболічними можливостями та спектром кінцевих продуктів метаболізму, які можуть служити субстратами для росту або гальмувати ріст інших видів. Відомо про відсутність здатності *L. reuteri* РТА 5289 до ферментації ксиліту, сорбіту і маніту [11]. Але вплив додавання цих поліолів на бактеріотропні властивості безклітинних супернатантів *L. reuteri* не досліджувалися.

Метою дослідження було вивчення впливу безклітинних супернатантів, отриманих шляхом культивування *L. reuteri* DSM 17938 у дезінтегратах власних клітин з додаванням поліолів (ксиліту, сорбіту, маніту та гліцерину з глюкозою) на добовий приріст біомаси умовно-патогенних бактерій.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували пробіотичний штам *L. reuteri* DSM 17938 з препарату BioGaia (BioGaia AB, Швеція), який є дочірнім штамом *L. reuteri* ATCC 55730. Ліофільну масу піддавали регідратації і відновленню шляхом культивування впродовж 20 годин за температури 37 °С у тіогліколевому середовищі (Biolife, Італія). Після перевірки чистоти культури мікробну масу тричі відмивали від поживного середовища і готували суспензію клітин у стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду. Суспензію піддавали дезінтеграції термоциклованням, як описано раніше [12]. Дезінтеграт розділяли на 5 порцій. Перша порція (контрольна) залишалася без змін. До решти порцій дезінтеграту додавали поліоли: ксиліт (LX), сорбіт (LS), маніт (LM), досягаючи кінцевої концентрації 3 % або 73,7 мг/мл гліцерин з 72,1 мг/мл глюкозою (LG). В отримані дезінтеграти вводили суспензію свіжовиділених лактобактерій з оптичною густиною 10 одиниць за шкалою МакФарланда у співвідношенні 9:1 і культивували за температури 37 °С та мікроаерофільних умов впродовж 24 годин.

Одержані культури центрифугували впродовж 30 хвилин при 1000 г. Для подальших досліджень використовували супернатанти.

Як тест-культури використовували референтні штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922 та клінічний ізолят *Pseudomonas aeruginosa* № 23. Тест-культури культивували впродовж 24 годин при 37 °С на агарі Мюллера-Хінтона (Merck, Німеччина). Після перевірки чистоти культур, з них були приготовані інокуляти (суспензії з

оптичною густиною 0,5 одиниць за шкалою МакФарланда)

Вивчення впливу супернатантів на добовий приріст біомаси тест-культур проводили в стерильних 96-лункових полістиролових планшетах (ВАТ «Ексімкарготтрейд», Україна). Цукровий бульйон (ЦБ) з 1% глюкози, супернатанти та інокуляти додавали в досліджувані лунки у співвідношенні 6:3:1. Кінцева концентрація супернатантів в інкубаційному середовищі становила 30 % об. ЦБ з 1% глюкози, 0,9 % розчином натрію хлориду та інокулятами додавали в лунки з позитивним контролем (ПК) у такому ж співвідношенні. Кінцева концентрація мікробних клітин у дослідних та позитивних контрольних лунках становила $\sim 10^6$ КУО/мл. Негативні контрольні лунки (НК) містили лише ЦБ. Планшети, накриті кришками, інкубували протягом 24 годин при 35–37 °С в статичних умовах. Оптичну густину (ОГ) вмісту лунок вимірювали при 578 нм за допомогою мікропланшетного рідера «LisaScanEM» («ErbaLachemas.r.o.», Чеська Республіка). Розраховували індекси інгібування (або стимуляції) добового приросту біомаси тест-культур за формулою: $\Pi (IC) = (\Delta OG - \Delta OG_{ПК}) \div \Delta OG_{ПК} \times 100\%$, де ΔOG і $\Delta OG_{ПК}$ – зміни оптичної густини тестових і контрольних зразків протягом 24 годин відповідно.

Експерименти проводили тричі. Кожен зразок тестували в трьох повторях. Визначали середні значення отриманих показників зі стандартними відхиленнями ($x \pm SD$). Отримані дані піддавали статистичній обробці за допомогою програми Excel 2003 шляхом проведення одностороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) та наступного множинного порівняльного аналізу з використанням критерію Стьюдента з поправкою Бонферроні [6]. Відмінності між отриманими показниками вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Як видно з представлених на рис. 1 даних, єдиним поліолом, додавання якого в середовище культивування *L. reuteri* призводило до появи здатності супернатанта значно пригнічувати добовий приріст біомаси стафілококів, був гліцерин (П добового приросту біомаси становив 70,7 %). Додавання ксиліту і сорбіту не мало значного впливу на здатність супернатанту впливати на ріст стафілококів. Введення до складу середовища культивування маніту призводило до появи у супернатанту стимуляторних властивостей по відношенню до стафілококів. Добовий приріст стафілококів збільшився на 45,5 %.

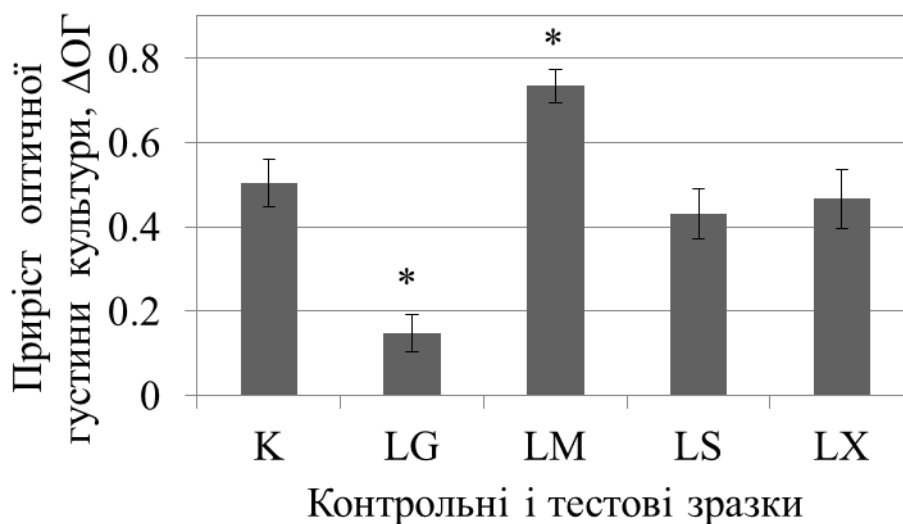


Рис. 1. Вплив безклітинних супернатантів культури *L. reuteri*, що культивувалася у дезінтеграції з додаванням поліолів, на добовий приріст біомаси тест-культури *S. aureus*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (K), $p < 0,05$.

Пригнічення добового приросту біомаси кишкової палички спостерігалось під дією супернатантів, отриманих після додавання до середовища культивування *L. reuteri* гліцерину (72,2 %) та ксиліту (16,5 %) (рис. 2). Додавання сорбіту не впливало на здатність супернатанту впливати на

приріст біомаси кишкової палички. Введення маніту до складу середовища культивування *L. reuteri* призводило до появи у супернатанта ріст-стимуляторних властивостей по відношенню до кишкової палички. Добовий приріст біомаси *E. coli* під дією такого супернатанта збільшувався на 19,1 %.

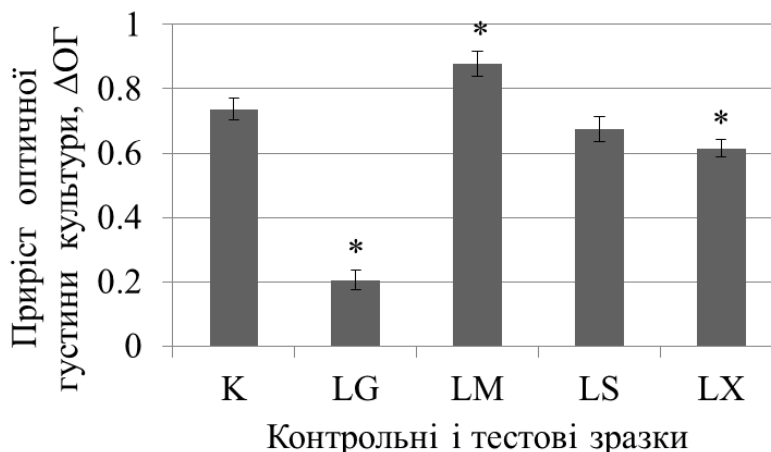


Рис. 2. Вплив безклітинних супернатантів культури *L. reuteri*, що культивувався у дезінтеграті з додаванням поліолів, на добовий приріст біомаси *E. coli*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (К), $p < 0,05$.

Єдиним поліолом, додавання якого до середовища культивування *L. reuteri* призводило до появи у супернатанта здатності пригнічувати на 74,7 % приріст біомаси *P. aeruginosa*, був гліцерин (рис. 3). Введення решти поліолів призводило до появи у

супернатантів ріст-стимуляторних властивостей по відношенню до синьогнійної палички. Добовий приріст біомаси псевдомонад збільшувався за впливу супернатантів LM на 19,9 %, LS – на 29,4 %, а LX – на 19,1 %.

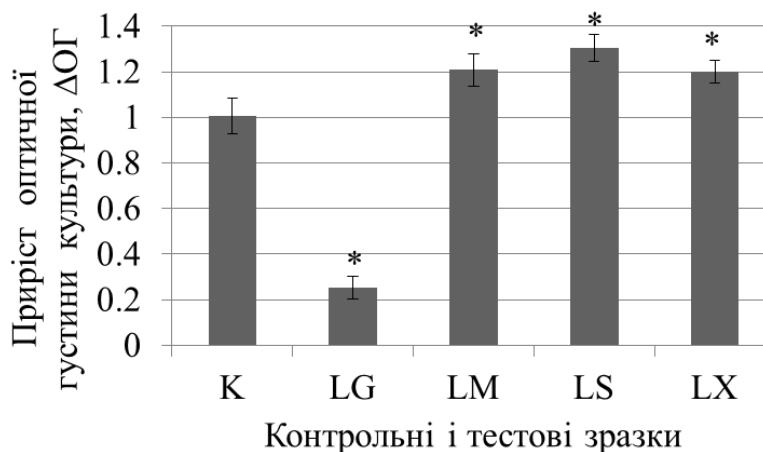


Рис. 3. Вплив безклітинних супернатантів культури *L. reuteri*, що культивувався у дезінтеграті з додаванням поліолів, на добовий приріст біомаси *P. aeruginosa*. Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем (К), $p < 0,05$.

Обговорення

Таким чином, додавання маніту до середовища культивування *L. reuteri* призводило до появи стимуляторних, а гліцерину – інгібіторних властивостей супернатанта по відношенню до всіх обраних тест-культур. Вплив ксиліту і сорбіту на властивості супернатанту *L. reuteri* залежав від виду тест культури. Обидва поліоли не впливали на бактеріотропну активність супернатанта по відношенню до *S. aureus* і надавали йому стимуляторних властивостей по відношенню до *P. aeruginosa*. Добовий приріст біомаси кишкової палички пригнічувався під дією супернатанта, отриманого при додаванні до середовища

культивування *L. reuteri* ксиліту і не змінювався – при додаванні сорбіту.

Отримані дані щодо гліцерину, введення якого в середовище культивування *L. reuteri* призводило до появи у супернатанта інгібіторної активності по відношенню до всіх тест-культур, були очікуваними, співпадають з результатами досліджень інших авторів і пов'язані зі здатністю даного виду лактобактерій до перетворення гліцерину в реутерин, протимікробну речовину з широким спектром дії [3, 4]. Відомо, що пробіотичний штам *L. reuteri* РТА 5289 не здатний ферментувати ксиліт, сорбіт і маніт з утворенням кислих кінцевих продуктів [11]. Отже, можна припустити, що вказані поліоли не піддавалися ферментації впродовж культивування *L. reuteri* у власному дезінтеграті і залишалися у незміненому

вигляді у складі супернатантів. Відомо, що маніт та сорбіт служать вуглеводним джерелом енергії для багатьох мікроорганізмів [13, 14]. Стимуляторним ефектом енергетичного субстрату можна пояснити збільшення добового приросту біомаси усіх тест-культур за впливу супернатанта, отриманого після культивування *L. reuteri* у власному дезінтеграті з додаванням маніту та збільшення добового приросту біомаси *P. aeruginosa* за впливу супернатанта, отриманого після культивування *L. reuteri* у власному дезінтеграті з додаванням сорбіту. Отримані дані щодо маніту добре узгоджуються з повідомленим Мооге зі співавторами значним підвищенням проліферативної активності *P. aeruginosa* при додаванні до середовища культивування D-маніту у концентраціях 0–20% [15]. Супернатант, отриманий в результаті культивування *L. reuteri* в дезінтеграті з додаванням ксиліту, виявив різний вплив на приріст біомаси тест-культур. Попередніми дослідженнями низки авторів встановлено відсутність бактерицидної і бактериостатичної активності ксиліту по відношенню до *S. aureus* ATCC 25923, трьох штамів *P. aeruginosa* (ATCC 27853, ATCC 9027 і клінічного ізоляту) та двох штамів *E. coli* (ATCC 8739 і ентеропатогенного клінічного ізоляту) [14, 16, 17, 18]. Тому пригнічення росту *E. coli* за впливу супернатанта, отриманого після культивування *L. reuteri* в присутності ксиліту, можна пояснити модифікацією поліолу та чутливістю до модифікованого продукту даного штаму кишкової палички.

Висновок

Результати дослідження показали, що використання ксиліту, сорбіту та маніту як прекурсорів, а *L. reuteri* DSM 17938 як біотрансформаторної системи при розробці нових протимікробних препаратів із застосуванням стратегії спрямованого прекурсором біосинтезу, є неефективним. Вони також підтвердили, що супернатант, отриманий після культивування *L. reuteri* DSM 17938 у власному дезінтеграті з додаванням гліцерину та глюкози, має виражену інгібіторну активність по відношенню до досліджених умовно-патогенних мікроорганізмів.

The influence of polyols on the bacteriotropic properties of the *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants

¹Knysh O.V., ¹Martynov A.V., ²Voyda Yu.V., ¹Babych Ye.M.¹

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology
²Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Introduction. Precursor directed biosynthesis is one of the promising approaches to finding new antimicrobial agents and creating next-generation probiotics. *L. reuteri* is capable to convert triatomic polyol glycerol into reuterine, a broad-spectrum antimicrobial substance. There are no data on the use of other polyols as precursors. The aim of the research was to investigate the effect of cell-free supernatants obtained by culturing *L. reuteri* DSM 17938 in its own disintegrate, supplemented

with polyols (xylitol, sorbitol, mannitol and glycerol & glucose) on the daily biomass growth of opportunistic microorganisms. **Material & methods.** Reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate were used as a test cultures. The effect of the lactobacillus supernatant on the daily biomass growth of the test cultures was investigated by spectrophotometry using a 96-well polystyrene microtiter plates and a «LisaScanEM» spectrophotometer («ErbaLachemas.r.o.», Czech Republic). The final concentration of supernatants in the incubation medium was 30%, and the final concentration of bacterial cells was $\sim 10^6$ CFU/ml. Inhibition (II) or stimulation (SI) indices of the daily biomass growth of test cultures by formula were calculated. **Results & discussion.** Supplementation of culture medium with glycerol & glucose during *L. reuteri* cultivation resulted in the *S. aureus* (II = 70.7%), *Escherichia coli* (II = 72.2%) and *P. aeruginosa* (II = 74.7%) daily biomass growth inhibition. As a result of *L. reuteri* cultivation in its own disintegrate supplemented with mannitol, the supernatant acquired growth-promoting properties with respect to *S. aureus* (SI = 45.5%), *E. coli* (SI = 19.1%) and *P. aeruginosa* (SI = 19, 9%). The supernatant obtained after *L. reuteri* cultivation in disintegrate supplemented with sorbitol had no significant effect on the *S. aureus* and *Escherichia coli* daily biomass growth, but significantly stimulated the growth of *P. aeruginosa* (SI = 29.4%). The supernatant of *L. reuteri*, cultured in disintegrate supplemented with xylitol had no effect on staphylococcus growth, inhibited of *E. coli* (II = 16.5%) growth and increased of *P. aeruginosa* (SI = 19.1%) daily biomass growth. The data obtained for glycerol, the introduction of which into the culture medium of *L. reuteri* led to the appearance of inhibitory activity of the supernatant against all test cultures, were expected. They coincide with the results of studies by other authors and are associated with the ability of this type of lactobacilli to convert glycerol into a broad-spectrum antimicrobial substance reuterin. The results of the study confirm that xylitol, sorbitol and mannitol do not undergo fermentation with the formation of acidic end products during the cultivation of *L. reuteri*. These polyols remain either unchanged or undergo slight modification in the composition of the supernatant and have different effects on the daily biomass growth of test cultures. **Conclusion.** The results of the study showed that the use of xylitol, sorbitol and mannitol as precursors, and *L. reuteri* DSM 17938 as a biotransformer system in the development of new antimicrobials using a precursor-directed biosynthesis strategy is ineffective. They also confirmed that the supernatant obtained after cultivation of *L. reuteri* DSM 17938 in its own disintegrate supplemented with glycerol & glucose, has a pronounced inhibitory activity against the investigated opportunistic microorganisms.

Keywords: polyols, *Lactobacillus reuteri*, cell-free, supernatants

References

1. Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 757. doi:10.3389/fmicb.2018.00757
2. Britton, R. A. (2017). *Lactobacillus reuteri*. In *The Microbiota In Gastrointestinal Pathophysiology* (pp. 89-97). Academic Press, London. doi: 10.1016/B978-0-12-804024-9.00008-2
3. De Weirdt, R., Crabbé, A., Roos, S., Vollenweider, S., Lacroix, C., van Pijkeren, J. P., Britton, R. A., Sarker, Sh., Van de Wiele, T., & Nickerson, C. A. (2012). Glycerol supplementation enhances *L. reuteri*'s protective effect against *S. typhimurium* colonization in a 3-D model of colonic epithelium. *PLoS ONE*, 7(5), e37116. doi:10.1371/journal.pone.0037116
4. Spinler, J. K., Auchtung, J., Brown, A., Boonma, P., Oezguen, N., Ross, C. L., Luna, R. A., Runge, J., Versalovic, J., Peniche, A., Dann, S. M., Britton, R. A., Haag, A., & Savidge, T. C. (2017). Next-generation probiotics targeting *Clostridium difficile* through precursor-directed antimicrobial biosynthesis. *Infection and Immunity*, 85(10), e00303-17. doi:10.1128/iai.00303-17
5. Gul, P., Akgul, N., & Seven, N. (2018). Anticariogenic potential of white cheese, xylitol chewing gum, and black tea. *European Journal of Dentistry*, 12(2), 199–203. doi:10.4103/ejd.ejd_4_18
6. Chen, X., Jiang, Z.-H., Chen, S., & Qin, W. (2010). Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 834–844. doi:10.7150/ijbs.6.834
7. Sarmiento-Rubiano, L. A., Zúñiga, M., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2007). Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Research in Microbiology*, 158(8-9), 694–701. doi:10.1016/j.resmic.2007.07.007
8. Dufossé, L., & Fouillaud, M. (2019). Editorial: Microbial biotechnology providing bio-based components for the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 10, 16. doi:10.3389/fmicb.2019.02843
9. Ortiz, M. E., Bleckwedel, J., Fadda, S., Picariello, G., Hebert, E. M., Raya, R. R., & Mozzi, F. (2017). Global analysis of mannitol 2-dehydrogenase in *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 during mannitol production through enzymatic, genetic and proteomic approaches. *PLOS ONE*, 12(1), e0169441. doi:10.1371/journal.pone.0169441
10. Yang, H., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2017). Microbial production and molecular engineering of industrial enzymes: challenges and strategies. In *Biotechnology of Microbial Enzymes* (pp. 151-165). Academic Press. doi:10.1016/b978-0-12-803725-6.00006-6
11. Hedberg, M., Hasslöf, P., Sjöström, I., Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria – an *in vitro* study. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(6), 482–485. doi:10.1111/j.1399-302x.2008.00457.x
12. Knysh, O. V., Isaenko, O. Y., Babych, E. M., Kompaniets, A. M., Pakhomov, O. V., Polyanska, V. P., Zacheplyo, S.V., & Danilova I.S. (2018). Antimicrobial activity of bifidobacteria derivatives after storage in a frozen state. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 28(3), 237–248. doi:10.15407/cryo28.03.237
13. Kozlova, Y. N., Fomenko, N. V., Morozova, V. V., Saranina, I. V., Tikunov, A. Y., Ganichev, D. A., Samokhin, A. G., Pavlov, V. V., Rozhnova, O. M., Bondar', I. A., Zenkova, E. V., Nimaev, V. V., Klimontov, V. V., & Tikunova, N. V. (2017). Genetic and biochemical characterization of staphylococci occurring in Novosibirsk, Russia. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 21(8), 952–958. doi:10.18699/vj17.318
14. Ferreira, A. S., Barbosa, N. R., Júnior, D. R., & da Silva, S. S. (2009). *In vitro* mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 505-509). doi:10.1142/9789812837554_0105
15. Moore, J. E., Rendall, J. C., & Downey, D. G. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* displays an altered phenotype *in vitro* when grown in the presence of mannitol. *British Journal of Biomedical Science*, 72(3), 115–119. doi:10.1080/09674845.2015.11666807
16. Sousa, L. P. de, Silva, A. F. da, Calil, N. O., Oliveira, M. G., Silva, S. S. da, & Raposo, N. R. B. (2011). *In vitro* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by Xylitol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 877–884. doi:10.1590/s1516-89132011000500004
17. Silva, A. F. da, Suzuki, Ê. Y., Ferreira, A. S., Oliveira, M. G., Silva, S. S. da, & Raposo, N. R. B. (2011). *In vitro* inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by Xylitol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 235–241. doi:10.1590/s1516-89132011000200003
18. Ng, S.-F., & Leow, H.-L. (2015). Development of biofilm-targeted antimicrobial wound dressing for the treatment of chronic wound infections. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(11), 1902–1909. doi:10.3109/03639045.2015.1019888