

Universitatea din București
Facultatea de Biologie

*Studii moleculare asupra unor tulpini de
bacterii lactice cu potențial probiotic*

Lector dr. Diana Pelinescu

2010

Probiotice = „microorganismele viabile care administrate în cantități adecvate îmbunătățesc starea de sănătate a gazdei (organism uman și animal)” (Fuller R., 1989)

Efectul benefic al probioticelor

- previn aderarea MO patogene/ potențial patogene
- sintetizează compuși cu acțiune antimicrobiană
(bacteriocine, acizi organici)
- au acțiune hipocolesterolemiantă
- ameliorează digestibilitatea alimentelor
- neutralizează anumiți compuși toxici (micotoxine)
- stimulează imunitatea gazdei
- au acțiune anticancerigenă

Preocupări actuale/ viitoare

- izolarea tulpinilor microbiene cu potențial probiotic din nișe ecologice specifice
- încadrarea taxonomică riguroasă
- caracterizarea funcțională a tulpinilor - studii *in vitro* și *in vivo*
- elucidarea mecanismelor implicate în efectul probiotic
- evaluarea siguranței utilizării microorganismelor probiotice
- evaluarea eficienței utilizării probioticelor comparativ cu tratamentele “standard”

Selecția celor mai valoroase tulpini

Posibilități de potențare a efectului probiotic

Izolarea tulpinilor de BL din diverse nișe ecologice



➤ lichid ruminal de vițel



➤ vegetale fermentate



➤ siloz



➤ stomac de porc



➤ fecale de nou-născut



➤ produse lactate



➤ produse de panificație



Caracteristici morfologice ale coloniilor
pe mediu MRS+CaCO₃ (CMGB3)

Colectie bacterii lactice
~ 310 tulpini

morfologia coloniilor
și a celulelor
caracterul Gram

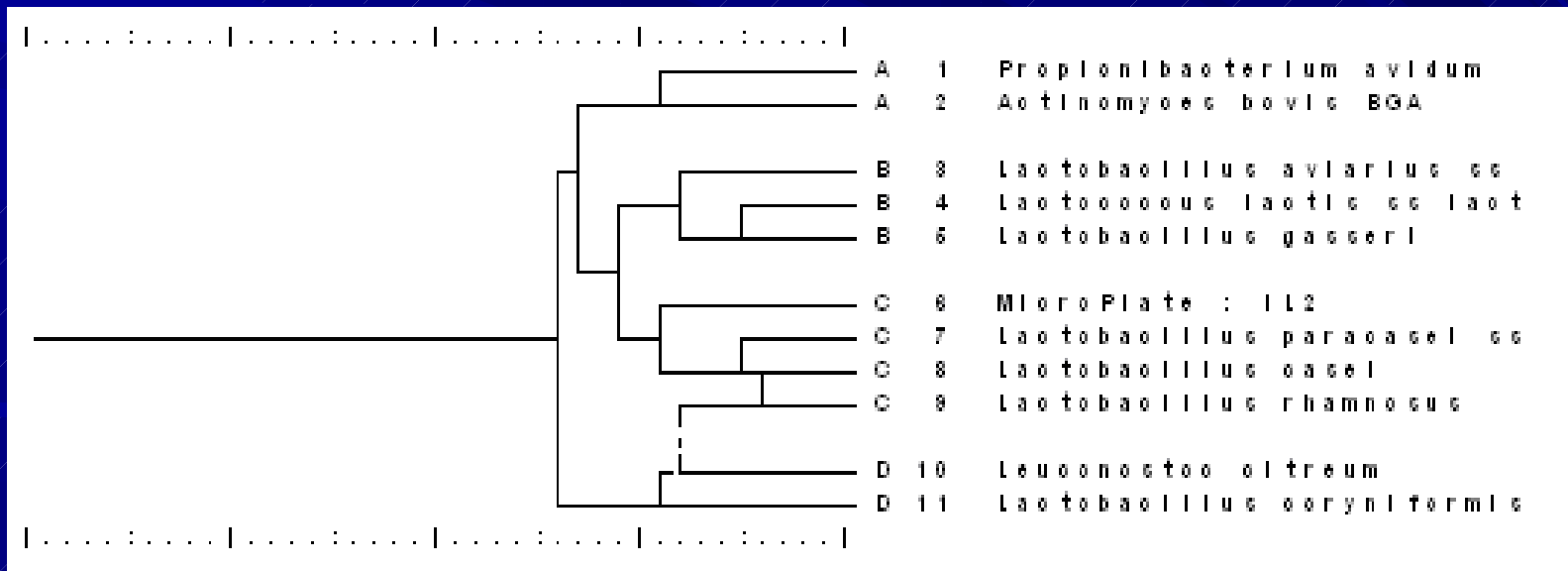
biosinteza de acizi organici

producerea de catalaza

Caracterizarea și identificarea taxonomică a tulpinilor de BL

Tehnici convenționale:

- teste morfologice
- teste fiziologice
- sisteme API, BIOLOG



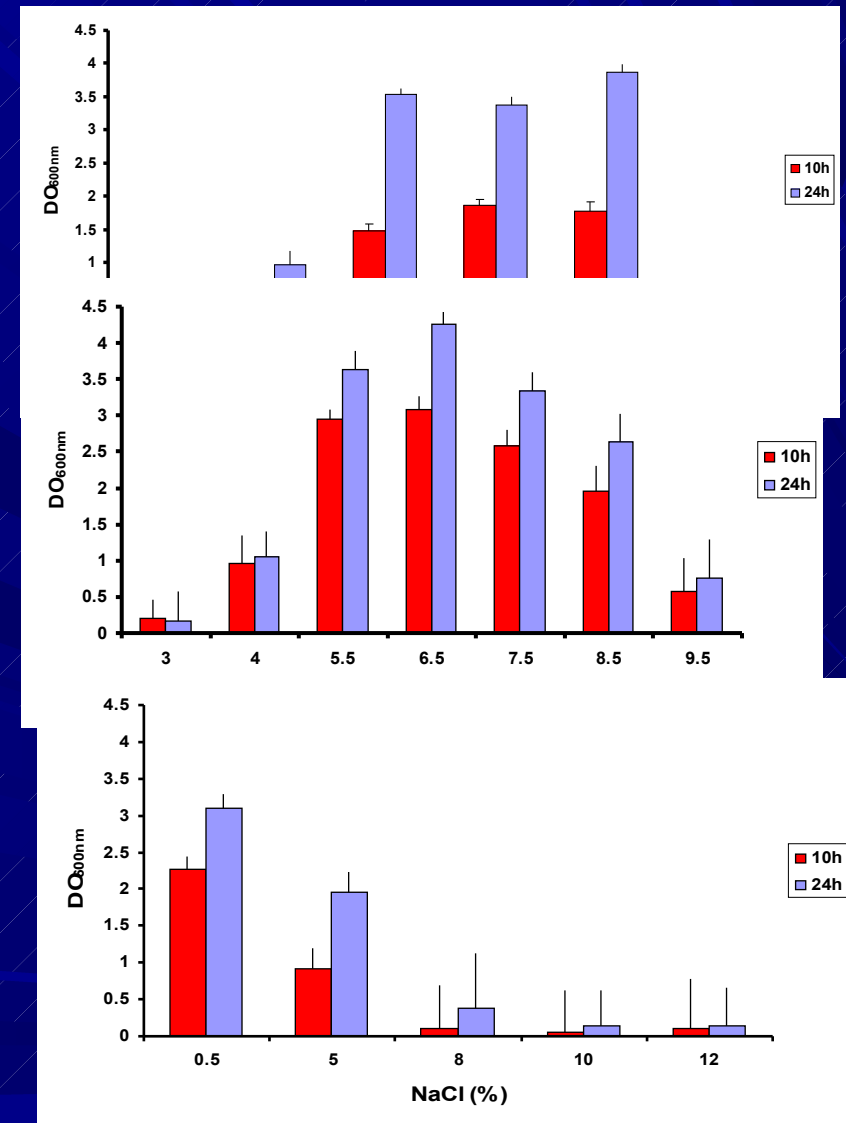
Dendrograma obtinuta utilizand Systemul MicroLog 4.2 pentru tulpina IL2 (similitudine 99% cu specia *Lactobacillus paracasei*)

Determinarea parametrilor de creștere a tulpinilor de BL

► Temperatura
majoritatea între 28°C și 42°C

► pH optim : 6.5 ± 1

► Concentrația NaCl
0.5% - 5% - dezvoltare optimă
8% - dezvoltare lentă



Spectrul de sensibilitate la antibiotice

Clase de antibiotice testate:

- peniciline
- cefalosporine
- aminoglicozide
- quinolone
- polipeptide
- tetraciclina
- macrolide
- rifamicine
- furani
- sulfamide



Spectrul de sensibilitate la antibiotice - *Lb. plantarum* CMGB 3



Spectrul de sensibilitate la antibiotice - *Lb. plantarum* CMGB 2

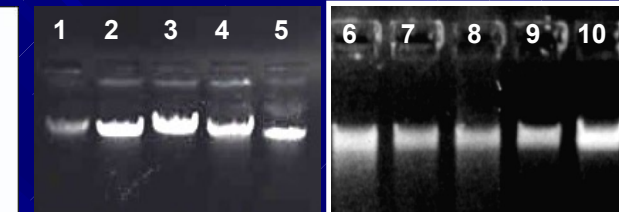
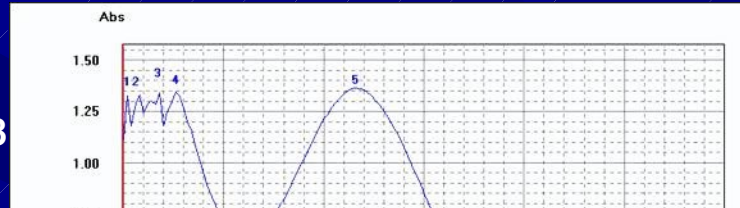
- ⇒ tulpinile studiate prezintă rezistență multiplă - tulpină specifică
- ⇒ majoritatea tulpinilor sunt rezistente la cefalosporine și tetraciclina
- ⇒ toate tulpinile de *E. faecium* prezintă sensibilitate la vancomicina

Analize moleculare cu valoare taxonomică

➤ Optimizarea unui protocol de izolare ADN cromozomal din BL

Concentrația: 1.7 – 3.2 mg/ml

Puritate (A_{260}/A_{280}): 1.88 – 1.98



Concluzii

➤ deși este doar un parametru negativ (de excludere), valorile % mol G+C au confirmat datele obținute prin tehnicile de taxonomie convenționale

➤ Determinarea procentului molar de guanină – citozină: T_m



Curba de topire ADN cromozomal
Lb. plantarum CMGB 3

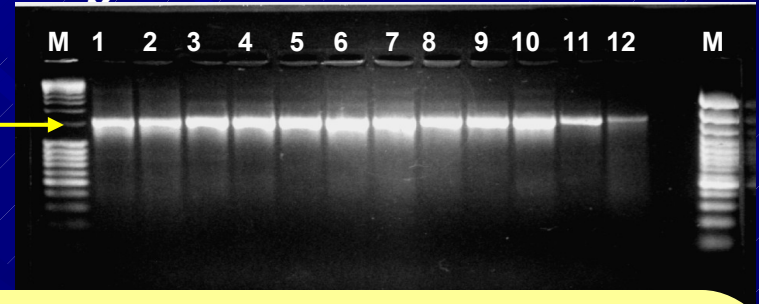
	% mol GC	Literatura de specialitate
<i>Lb. plantarum</i> CMGB 1, 2, 3, 15	52,5 – 53,96	52 - 54
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CMGB 18	54,38	54 - 56
<i>E. faecium</i> CMGB 6, 8, 10, 16, 17	32,54 – 37,53	32 - 38

➤ **ARDRA – Amplified rDNA Restriction Analysis**

Amplificarea prin PCR a genei pentru ARNr 16S

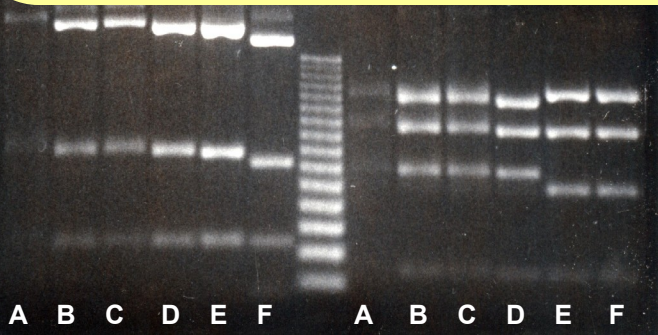
Primeri utilizați
GM3F- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
(poziția 8-24 *E.coli* ADNr 16S)
GM4D- ACCGCAAGCCGCGCA

~1500pb

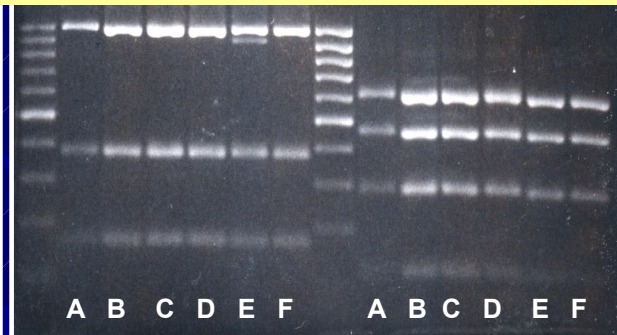


Concluzii

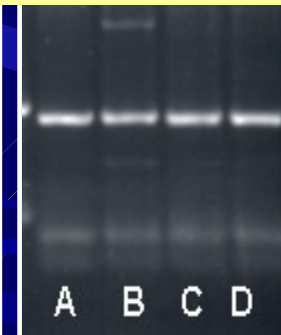
**Izolatele conspecifice analizate reprezintă tulpini distincte,
dar foarte înrudite genetic :
aparțin unei aceleiași unități taxonomice operaționale
(OTU = Operational Taxonomic Unit)**



A – *Lb. plantarum* ATCC 8014
B – CMGB 1; C – CMGB 2; D – CMGB 3;
E – CMGB 15; F – CMGB 18



A – *E. faecium* IC 14903;
B – CMGB 6; C – CMGB 8; D – CMGB 10;
E – CMGB 16; F – CMGB 17



A – CMGB 1; B – CMGB 3
C – CMGB 16; D – CMGB 17

Analize moleculare cu valoare taxonomică

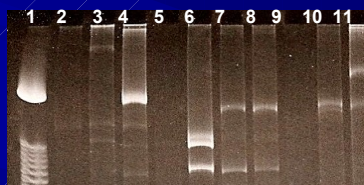
⇒ Random Amplification of polymorphic DNA (RAPD)

⇒ Repetitive Extragenic Palindrome (REP-PCR)

Primeri utilizați

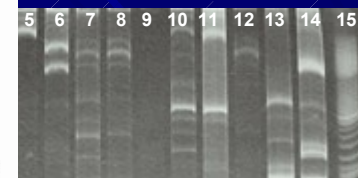
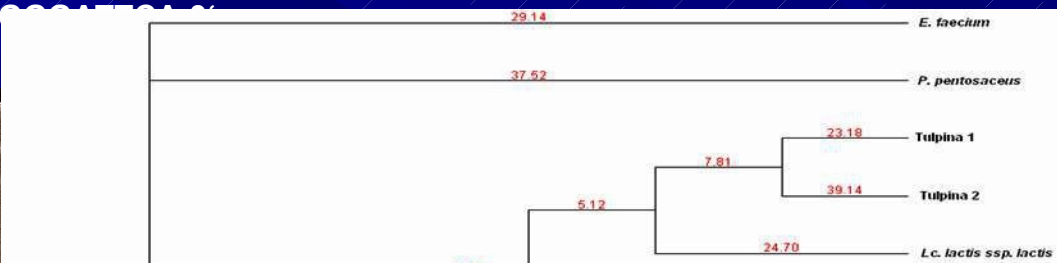
RAPDf 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG – 3'

RAPDr 5'-AAGCTCCTG



Primeri utilizați

Rep1 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'



Concluzii

Tulpinile nou izolate de bacterii lactice au fost incadrate taxonomic pe baza tehincilor conventionale si moleculare in specii apartinand genurilor:

Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus si Pediococcus

7-15b; 8-SB; 9-VL21; 10-GM14;

11-*Lb. platarum* ATCC 8014; 12-*Lb. casei* 13240;

13-*Lb. acidophilus* ATCC 4356; 14-*Lb. bifidus* ATCC 13213;

15-marker-100kb DNA (Promega).

7-15b; 8-SB; 9-VL21; 10-GM14;

11-*Lb. platarum* ATCC 8014; 12-*Lb. casei* 13240;

13-*Lb. acidophilus* ATCC 4356; 14-*Lb. bifidus* ATCC 13213;

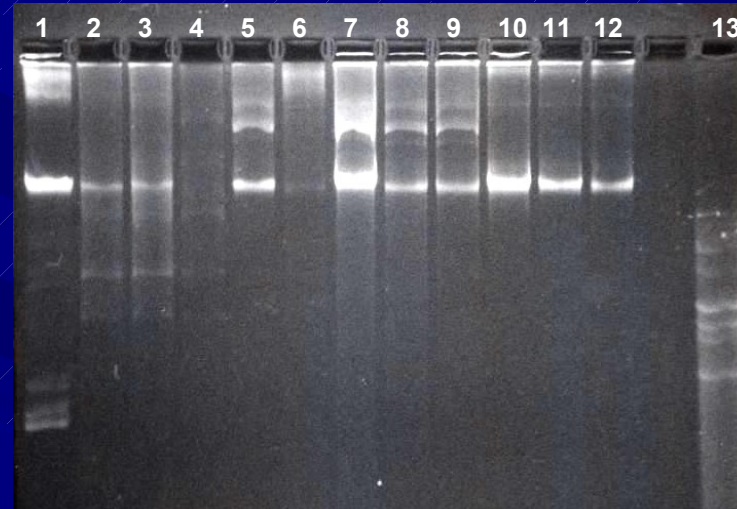
15-marker-100kb DNA (Promega).

STUDII pe ADN PLASMIDIAL la BL

Tehnici:

Birnboim-Doly
(plasmide mici 1-60Kpb)

Anderson & McKay
(ADN total, plasmide mari, 100-300Kpb)



ADN plasmidial

ADN cromozomal

ADN plasmidial

ADN genomic extras din tulpinile:

1, 13 - *E. coli* V517

2 - 11 - CMGB 1,2,3,6,8,10,15,16,17

12 - CMGB 16 (bac⁻)

CMGB 1-3: același profil plasmidial – 2 plasmide 4,7 și 8 kpb
CMGB 6,8,10: același profil plasmidial – 3 plasmide > 54 kpb
CMGB 16,17: nu prezintă plasmide

Efectul probiotic - studii *in vitro*

► Determinarea activității antimicrobiene

Testarea a 250 de tulpini de BL față de 30 de tulpini patogene/potential patogene din genurile: *Bacillus*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*, *Propionibacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Candida*, *Fusarium* și *Aspergillus*

Acizi organici

- lactic
- acetic
- fenilactic
- hidroxifenilactic

Bacteriocine

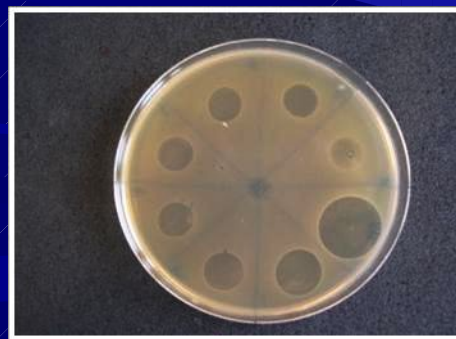
Determinarea
masei moleculare

Spectrul
de inhibiție

Stabilitatea

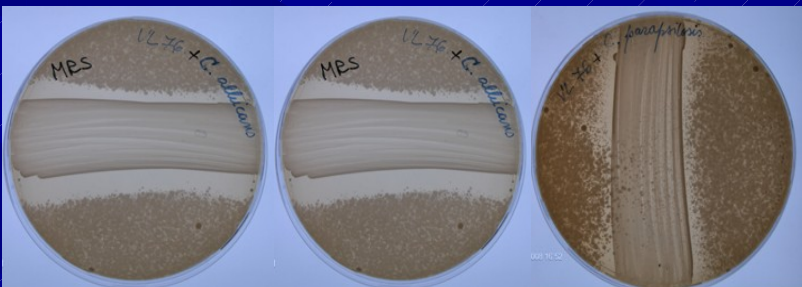
Purificarea prin
FPLC

Majoritatea BL- activitate antimicrobiană față de una sau mai multe tulpini patogene/ potențial patogene



- *E. faecium* CMGB 16
- *E. faecium* CMGB 17

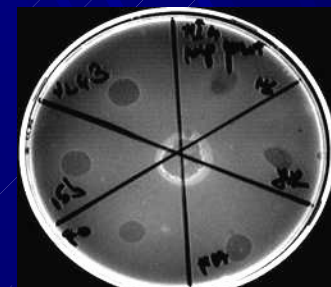
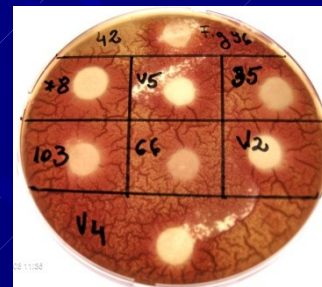
Acizi organici



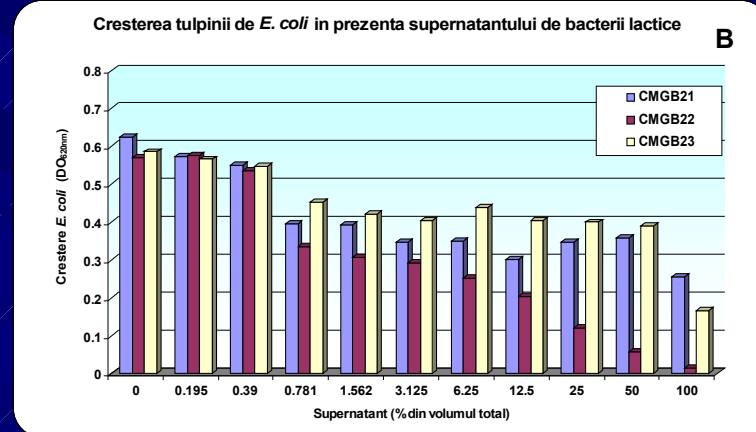
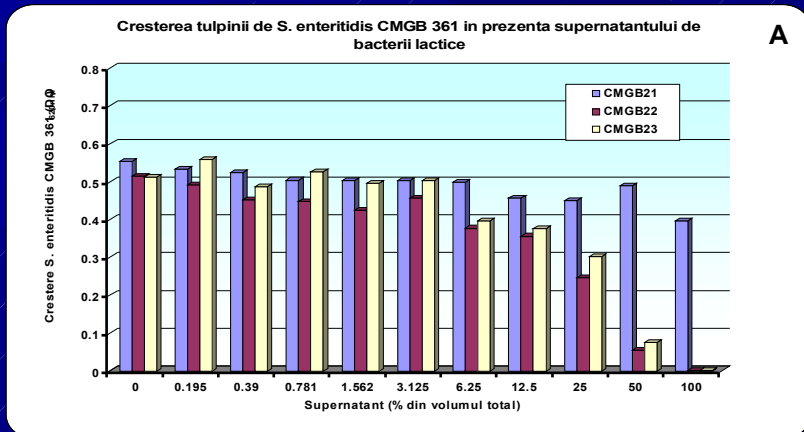
Ațiunea antimicrobiană a bacteriilor lactice față de *C. albicans* CMGB 320 și *C. parapsilopsis* CMGB 323



Activitatea antifungică a bacteriilor lactice față de *Aspergillus carbonarius* și *Fusarium graminearum* 96



Ațiunea antimicrobiană față de *Campylobacter jejuni* 81-176

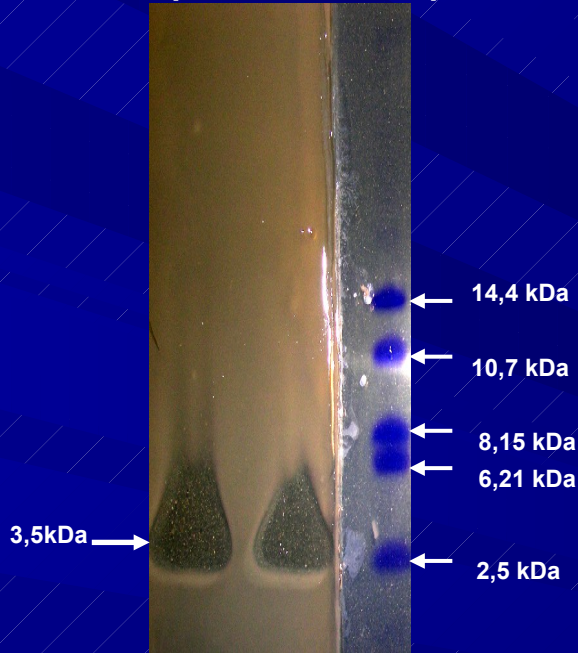


Majoritatea tulpinilor de bacterii lactice au prezentat activitate antimicrobiană față de una sau mai multe tulpini patogene sau potențial patogene

Activitatea antimicrobiană a fost corelată cu prezența de acizi organici acid lactic, fenilactic, hidroxifenilactic și acetic

Bacteriocine

Determinarea masei moleculare (SDS-PAGE)



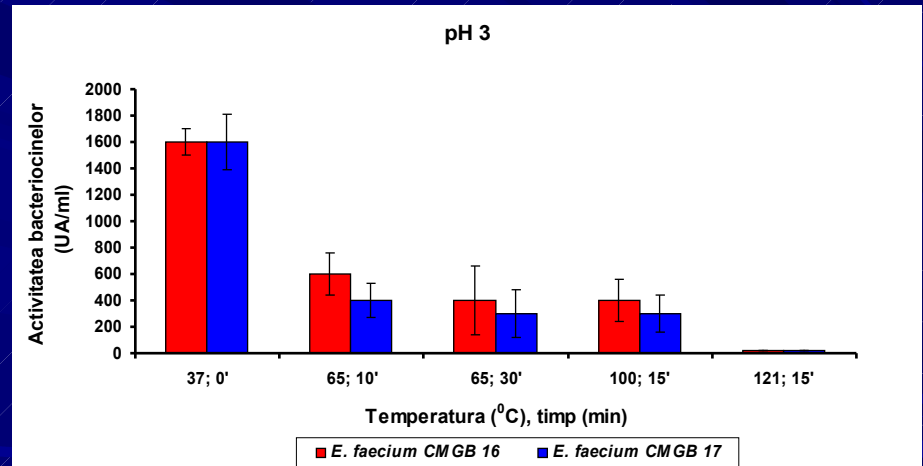
Electroforeza in sistem vertical a bacteriocinelor din: 1 - *E. faecium* CMGB 16; 2 - *E. faecium* CMGB 17; 3- Sigma Marker protein standard

Determinarea spectrului de inhibiție

- 10 tulpini din genul *Enterococcus*
- 9 tulpini de din genul *Lactobacillus*

Determinarea stabilității

- 65°C, 10 și 30 minute
- 100°C, 15 minute
- 121°C, 15 minute
- pH 3.0, 6.0 și 9.0

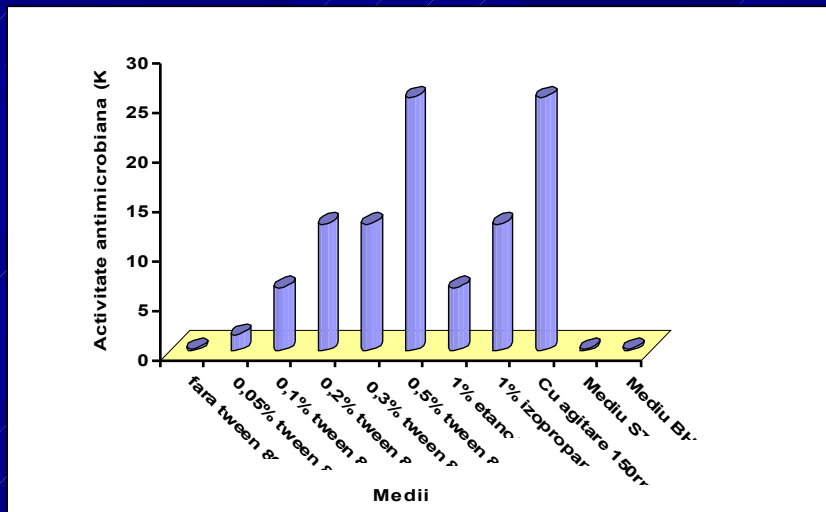


- Bacteriocinele izolate din *E. faecium* CMGB 16 și 17 - masă moleculară 3,4kDa spectru de inhibiție similar
- Stabilitate ridicată la variații de temperatură și pH

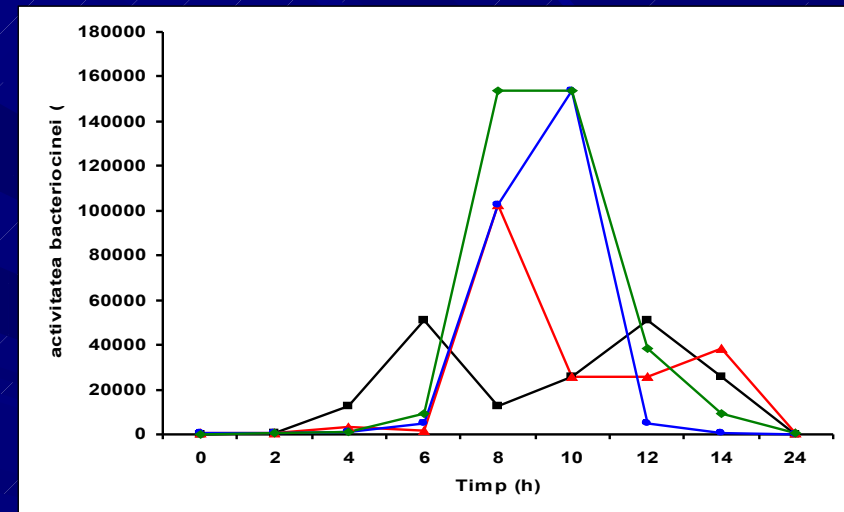
INFLUENTA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA BIOSINTEZEI DE BACTERIOCINE

- concentratii diferite de Tween 80
- diferite medii (ST, BHI)
- adaos de alcool (izopropanol, etanol)
- cultivare in aerobioza

- Fermentatii la pH controlat (6.5) si necontrolat
- MRS avand ca unica sursa de carbon glucoza, respectiv rafiloza



Activitatea antimicrobiană a tulpinii *E. faecium* CMGB 16 în diferite condiții de cultivare față de tulpina indicator *E. faecium* CMGB 6



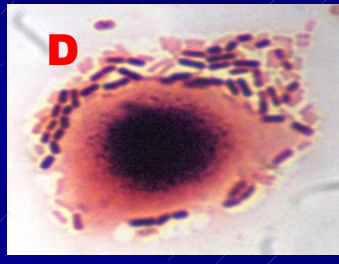
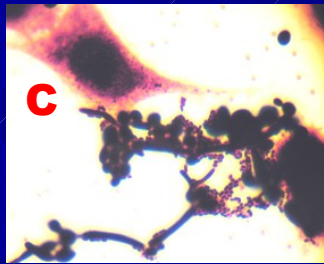
Determinarea activității bacteriocinei în timpul fermentației

- ◆ glucoza pH necontrolat, ● glucoza pH 6.5,
- ▲ rafiloza pH necontrolat, ■ rafiloza pH 6.5

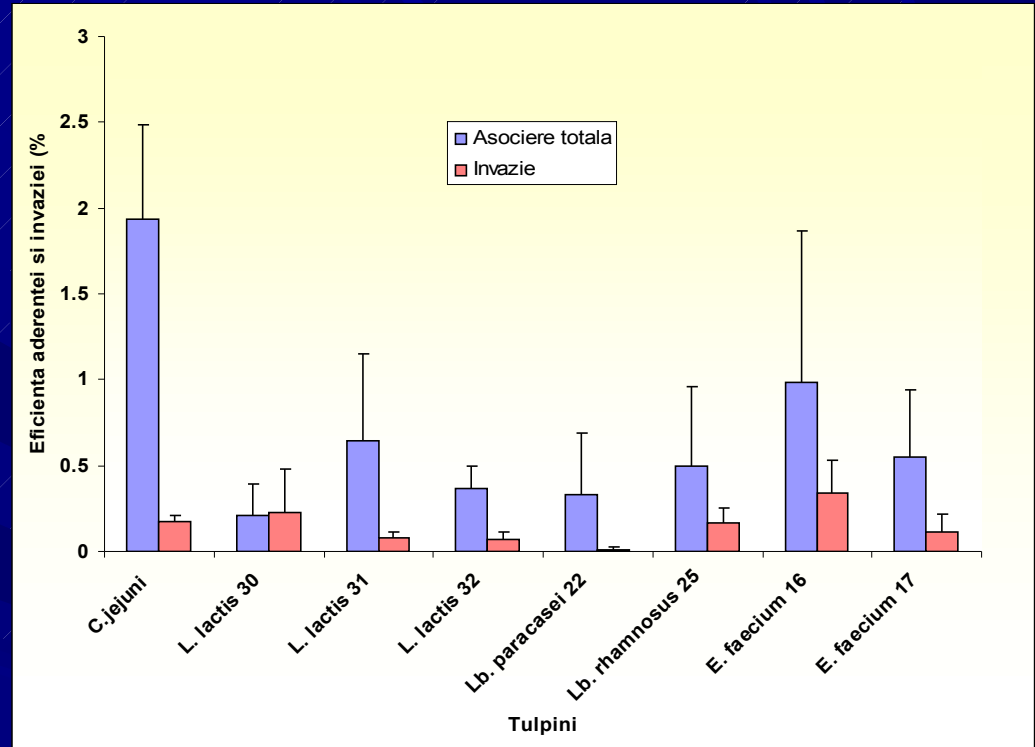
- ▶ cultivarea in aerobioza, concentratia de 0.5% Tween 80 si prezenta izopropanolului determina stimularea biosintezei de bacteriocine
- ▶ concentratia de bacteriocina este mai ridicata in cazul utilizarii glucozei ca sursa de carbon
- ▶ activitatea bacteriocinei a fost mai ridicata in cazul fermentatiilor care nu au implicat ajustarea pH-ului

Efectul probiotic - studii *in vitro*

► Aderență microbială



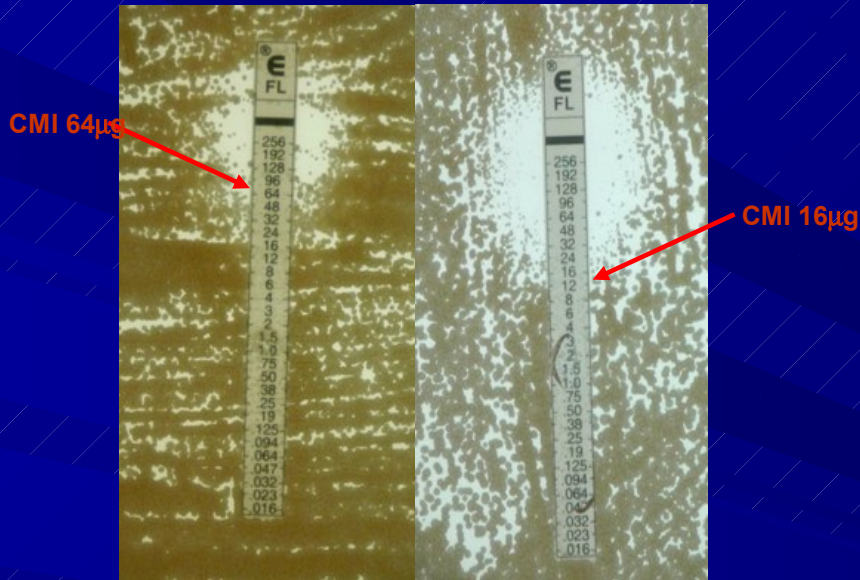
Aderența tulpinii *Lb. paracasei* CMGB18 (A), CMGB18 + *S. enteritidis* (B), CMGB18 + *C. albicans* (C), CMGB18 + *E. coli* (D) on HeLa cells (Colorație Gram)



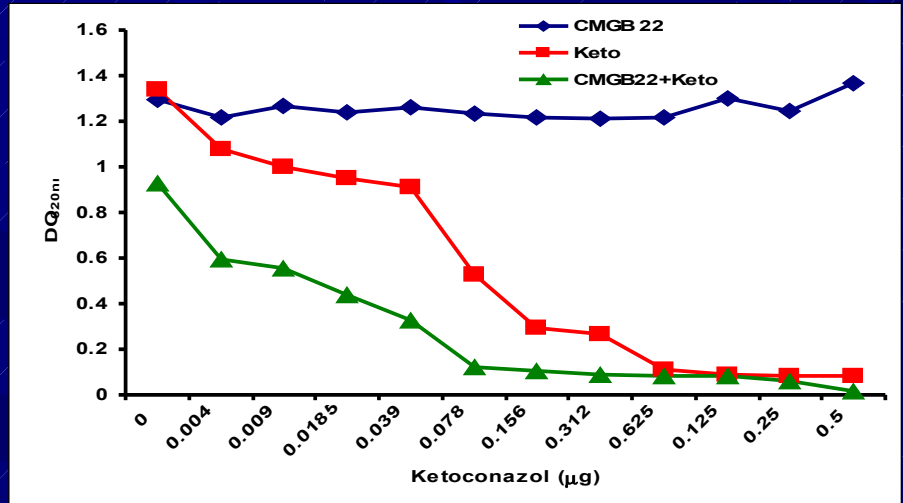
Capacitatea de aderență și invazie a tulpinii *Campylobacter jejuni* 81-176 în prezența tulpinilor de bacterii lactice

- **pattern de aderență agregativ sau difuz la celulele eucariote sau la suportul inert**
- **BL inhibă aderența și invazia unor tulpini patogene (*Escherichia*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Candida*)**

Influenta supernatantului de bacterii lactice asupra rezistentei tulpinilor de *Candida* la diferiti compusi cu actiune antifungica



Rezistenta tulpinii *C. parapsilosis* CMGB390 la fluconazol in prezenta supernatantului tulpinii of *Lb. paracasei* ssp. *Paracasei* CMGB 18 culture supernatant

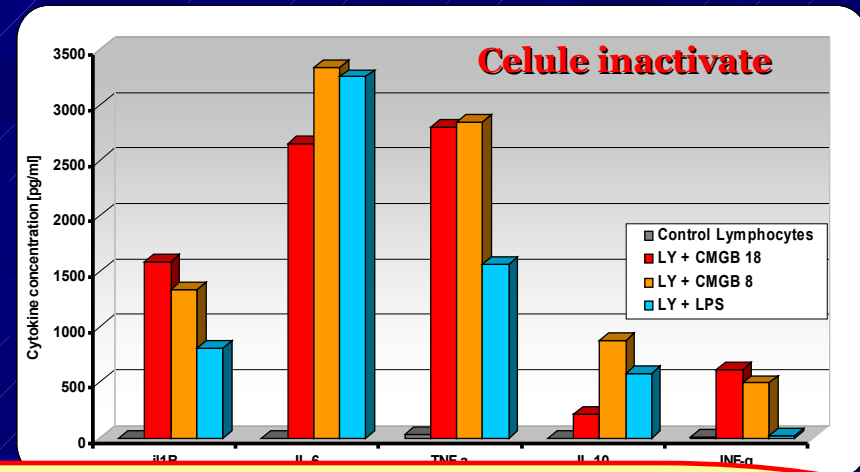
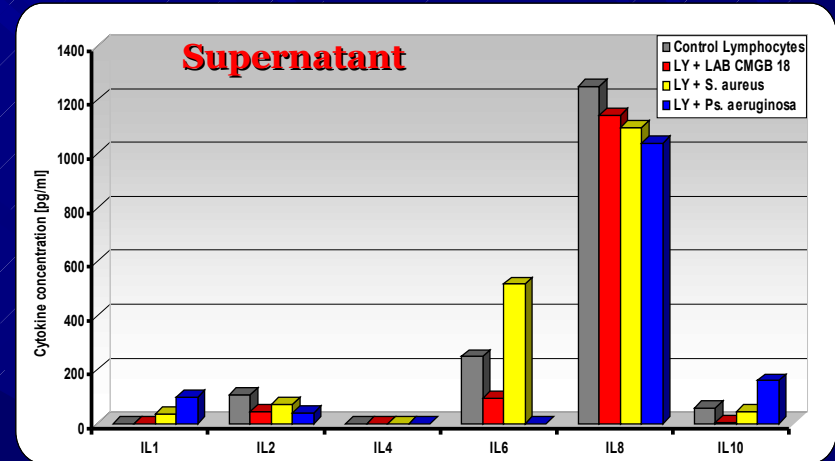
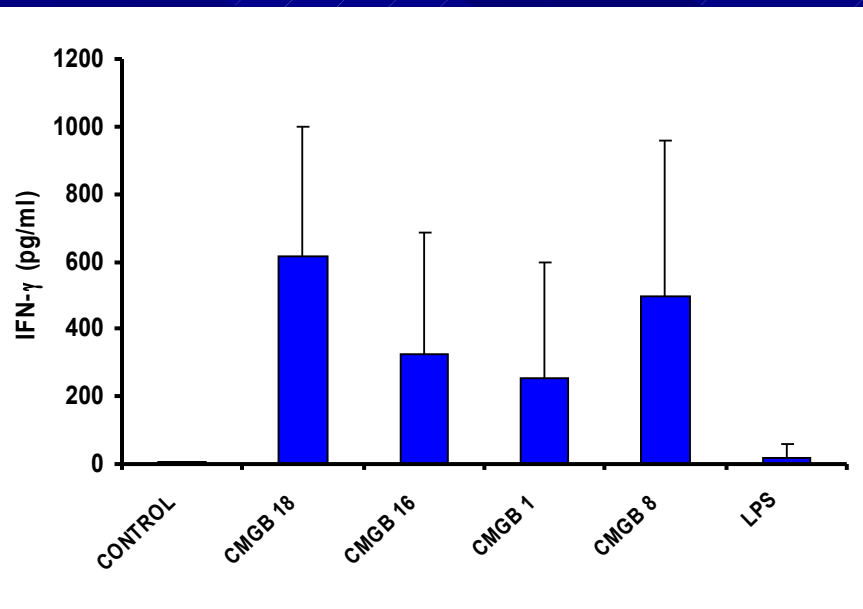


Rezistenta tulpinii *C. albicans* CMGB 320 la ketoconazol in prezenta supernatantului tulpinii *Lactococcus lactis* CMGB 22

- ▶ Supernatantul anumitor tulpini de bacterii lactice determina scaderea rezistentei tulpinilor apartinand genului *Candida* la compusi cu actiune antifungica
- ▶ Activitatea este tulpina specifica si compus antimicrobian specific

Efectul imunostimulator al bacteriilor lactice

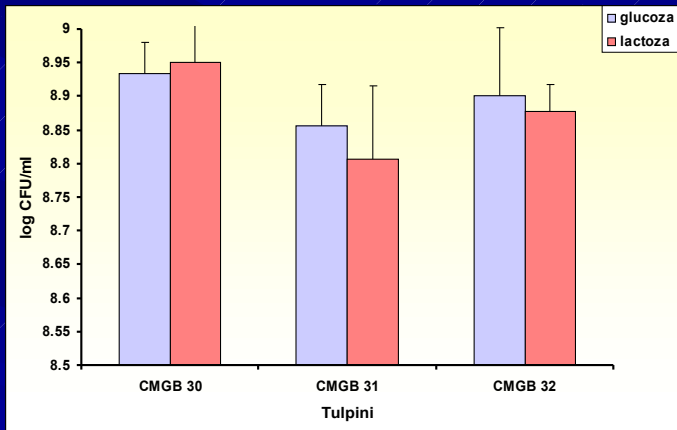
⇒ determinarea nivelului de secreție a citokinelor
IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-10, IFN- γ



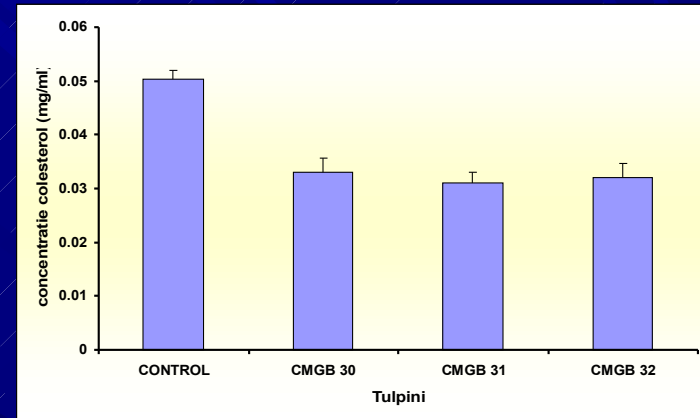
BL stimulează secreția de citokine pro- și anti- inflamatorii

***Lb. paracasei* ssp. *paracasei* CMGB 18 induce cea mai mare concentrație de IFN- γ și cea mai mică concentrație de IL-10**

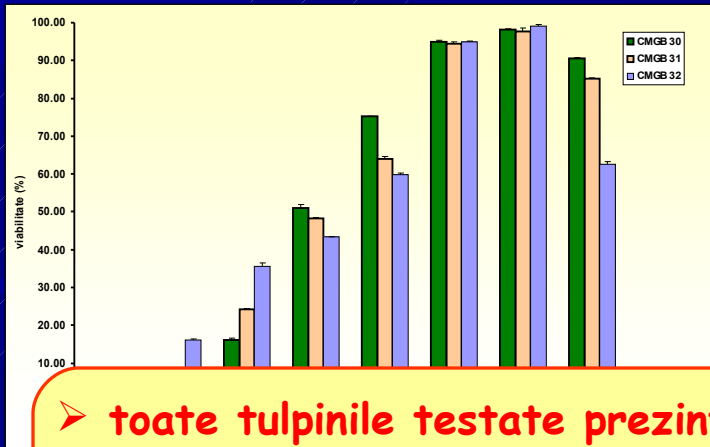
Metabolizarea lactozei



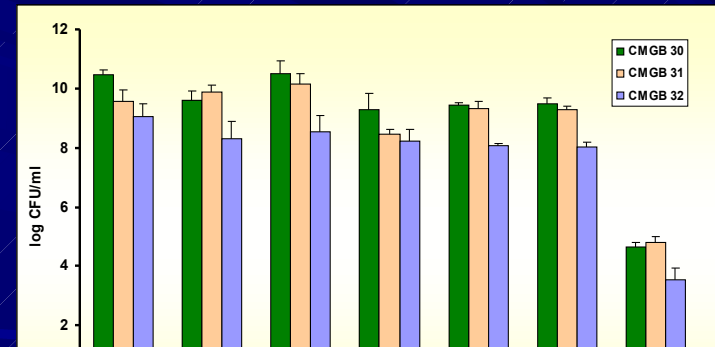
Scaderea concentratiei colesterolului



Rezistenta la variatii de pH



Rezistenta la saruri biliare



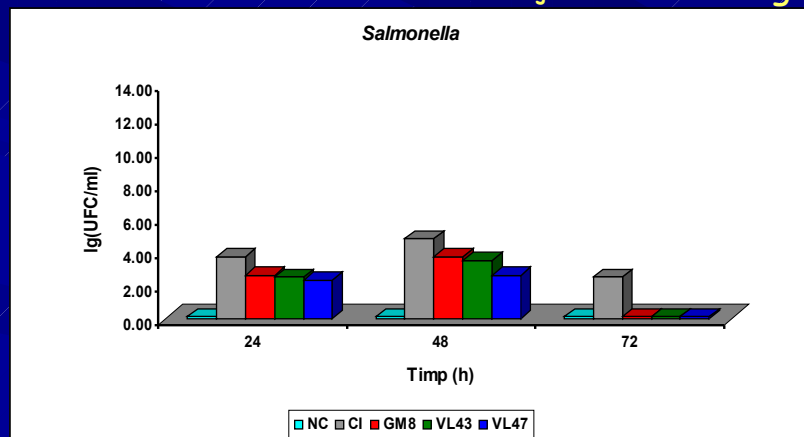
- toate tulpinile testate prezinta capacitatea de a metaboliza lactoza
- 6 tulpini analizate prezinta capacitate de scadere a concentratiei colesterolului cu pana la 50%
- rezistenta la variatii de pH si concentratii de saruri biliare este tulpina specifica

Efectul probiotic - studii *in vivo*

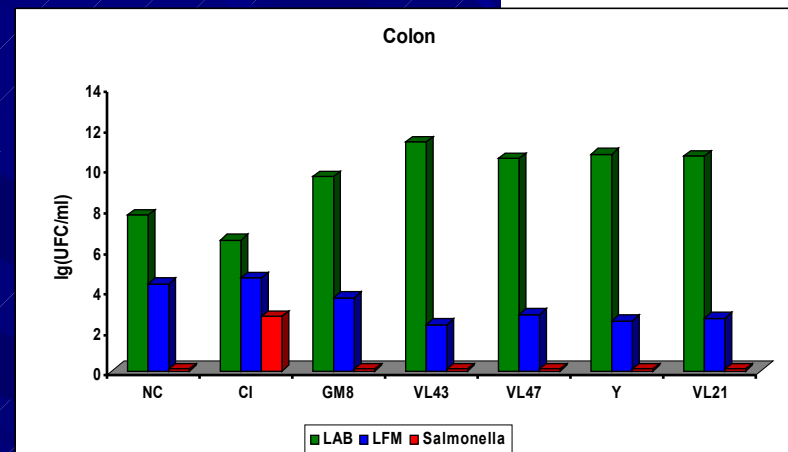


► Competiția cu microorganismele patogene

- ✓ administrarea BL - înainte/simultan/după infectarea cu *S. enteritidis*
- ✓ cuantificarea celulelor de MO lactozo-fermentative, BL și *S. enteritidis* în fecale și la nivelul segmentelor intestinale



Numărul de celule viabile de *S. enteritidis* eliminat în fecale administrare terapeutică



Numărul de celule viabile BL, LFM și *S. enteritidis* la nivelul colonului administrare terapeutică

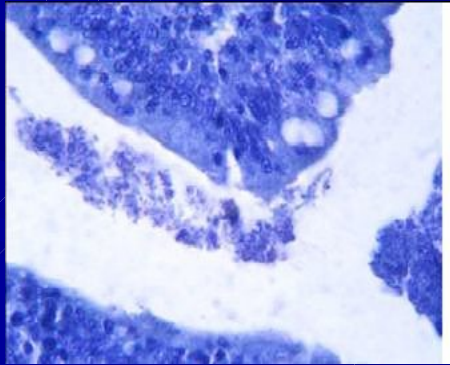
Tulpinile de BL determină:

- eliminarea bacteriilor patogene în fecale
- scăderea ratei de colonizare a tractului digestiv de către MO patogene
- eficiență ridicată în administrarea simultană

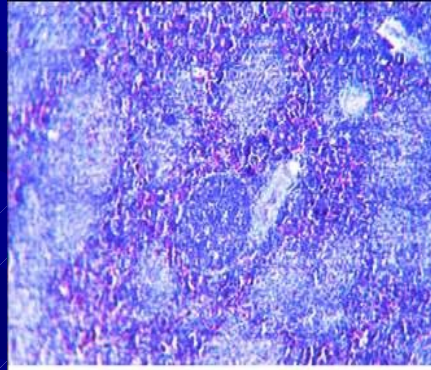
Tulpina *E. faecium* CMGB 8 prezintă activitate antimicrobiană față de *S. enteritidis*

Efectul probiotic - studii *in vivo*

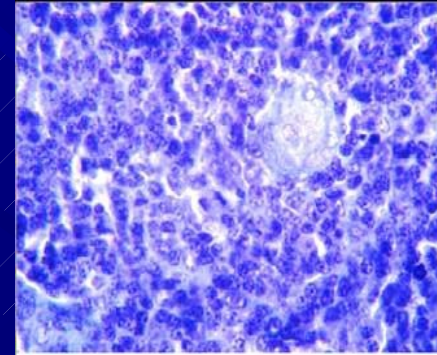
► Capacitatea de imunomodulare



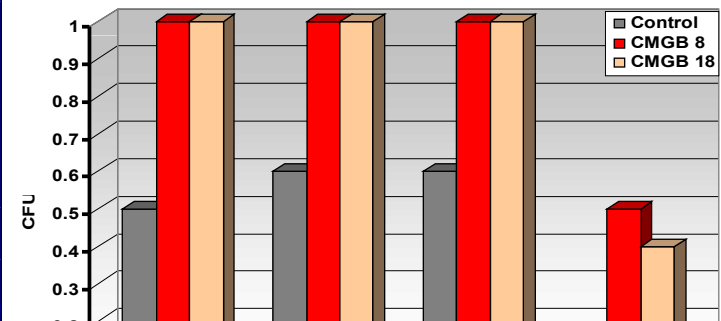
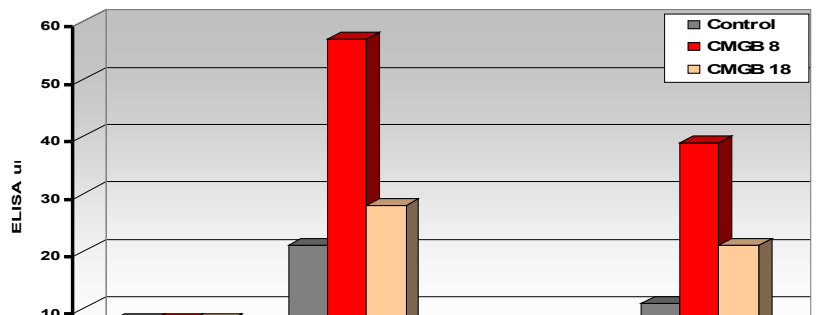
Lot *Lb.paracasei ssp. paracasei* CMGB 18. Joncțiune ileo-cecală



Lot *Lb.paracasei ssp. paracasei* CMGB 18. Splină. Reacție imunomodulatoare a țesutului limfoid



Lot *E. faecium* CMGB 8. Splină. Hiperreactivitate limfocitară numeroase mitoze și imunostimulare limfocitară.



- este activat răspunsul imun umoral/celular față de unele vaccinuri virale și față de bacterii patogene
- scade numărul microorganismelor patogene (*Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*) din tractul respirator, digestiv, splină și articulații

CONCLUZII GENERALE

- ✓ Au fost izolate 310 tulpini BL din surse specifice
- ✓ Identificare taxonomică – taxonomie polifazică
 - ▶ încadrarea taxonomică – gen și specie - tehnici de taxonomie convențională
 - ▶ confirmarea rezultatelor - tehnici de taxonomie moleculară
- ✓ Conservarea tulpinilor identificate în colecția de microorganisme a centrului MICROGEN
- ✓ Analiza mecanismelor implicate în efectul probiotic al tulpinilor BL pe modele *in vitro* și *in vivo*:
 - ▶ prezintă acțiune antimicrobiană datorată acizilor organici și bacteriocinelor
 - ▶ prezintă aderență crescută la celulele eucariote
 - ▶ Intră în competiție cu microorganismele patogene pentru colonizarea tractului digestiv și urogenital
 - ▶ stimulează sistemul imunitar umoral / celular
 - ▶ influențează exprimarea factorilor de virulență și patogenitate la microorganismele patogene
 - ▶ au capacitatea de scădere a concentrației de colesterol
 - ▶ metabolizează lactoza
 - ▶ prezintă rezistență la variații de pH și diferite concentrații de săruri biliare

**Universitatea din Bucuresti,
Facultatea de Biologie
MICROGEN**

Prof. dr. Tatiana Vassu
Prof.dr. Ileana Stoica
CSI.dr. Elena Sasarman
Prof.dr. Veronica Lazar
Conf. Dr. Carmen Chifiriuc
Conf.dr. Ortansa Csutak
CSII dr. Coralia Bleotu
Asist. Univ. drd. Ana Maria Tanase
Asist. Univ. drd. Lia – Mara Ditu
Drd. Ionela Avram
CSII Drd. Robertina Ionescu
CSIII Dr. Raluca Ghindea

University of Brussels

Prof.dr. Luc De Vuyst

**Soc. Nat. Inst.
Pasteur SA**

CSI. dr. Virgilia Popa

**University College Dublin
The National Children
Research Centre**

Prof.dr. Billy Bourke
Dr. Nicolae Corcionivoschi

**Inst. de Biologie
Bucuresti**

CSI Dr. Medana Zamfir
CS III Dr. Silvia Tudor

**Inst. National de C. D. pentru
Microbiologie si Imunologie
„Cantacuzino”**

CSI dr. Aura Salageanu
Catalin Tucureanu

**Inst. National de C D
Stiinte Biologice
Bucuresti**

Prof.dr. Lucian Radu

**Universitatea de Stiinte
Agronomice si Medicina
Veterinara Bucuresti**

Prof.dr. Adrian Vamanu
Lect. Dr. Emanuel Vamanu

DEXTER Com.S. R.L

Dr. Lorand Savu



microorganismele
patogene

microorganismele
probiotice

Bacterii lactice

Drojii

Va multumesc!