

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 616.9:579.864.1:577.112.3

doi: 10.17072/1994-9952-2022-3-212-217

О влиянии путресцина и кадаверина на функциональную активность *Lactobacillus* spp., изолированных из генитального тракта

Елизавета Викторовна Афанасьевская^{1✉}, Анатолий Петрович Годовалов²,
Тамара Исаковна Карпунина³

^{1,2,3} Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

^{1✉} lizavika@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3498-6459>

² agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

³ karpuninapsma@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Аннотация. Исследовано влияние диаминов бактериального происхождения на функциональную активность клинических штаммов *Lactobacillus* spp. Установлено дозозависимое действие путресцина на их ростовые характеристики. Кадаверин в концентрации 1 ммоль/л в среде культивирования существенно увеличивал накопление биомассы исследованных культур лактобацилл. Получены экспериментальные данные, подтверждающие дестабилизирующее влияние бактериальных аминов на вагинальные *Lactobacillus* spp. и, следовательно, их важную непосредственную роль в ослаблении биологической защиты вагинальной микросреды.

Ключевые слова: лактобактерии, кадаверин, путресцин, параметры роста

Для цитирования: Афанасьевская Е. В., Годовалов А. П., Карпунина Т. И. О влиянии путресцина и кадаверина на функциональную активность *Lactobacillus* spp., изолированных из генитального тракта // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 3. С. 212–217. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-3-212-217>.

MICROBIOLOGY

Original article

Functional activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the genital tract under the unfluence of putrescine and cadaverine

Elizaveta V. Afanasievskaya^{1✉}, Anatoliy P. Godovalov², Tamara I. Karpunina³

^{1,2,3} E.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, Russia

^{1✉} lizavika@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3498-6459>

² agodovalov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

³ karpuninapsma@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Abstract. Functional activity of *Lactobacillus* spp. was evaluated under the influence of bacterial diamines. The dose-dependent effect of putrescine on growth characteristics of clinical strains has been established. Cadaverine at a concentration of 1 mmol/l in the culture medium significantly stimulated the accumulation of biomass of the tested strains. The results obtained confirm the destabilizing effect of bacterial amines agents on vaginal *Lactobacillus* spp. and thus their important direct role in weakening the biological protection of the vaginal microenvironment.

Keywords: lactobacillii, cadaverine, putrescine, growth characteristics

For citation: Afanasievskaya E. V., Godovalov A. P., Karpunina T. I. [Functional activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the genital tract under the unfluence of putrescine and cadaverine]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 3 (2022): pp. 212–217. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-3-212-217>.

Введение

Многочисленные микробиологические исследования последних лет убедительно доказали, что в лю-бом биотопе организма человека существует разнообразная микрофлора, способная в значительной сте-

пени влиять на состояние здоровья. В свою очередь, состояние микробных сообществ определяется как микроокружением, так и взаимоотношениями их участников. Среди множества бактериальных метаболитов детектированы разнообразные соединения, «претендующие» на роль межмикробных коммуникаторов. В связи с этим биогенные полиамины (БП) и, прежде всего, кадаверин и путресцин, способные влиять на проявление практически всех функций прокариотических клеток [Нестерова, Цыганов, Ткаченко, 2020; Ткаченко и др., 2020], привлекают внимание исследователей микробиоценоза генитального тракта. Со времен Albert Döderlein (1892) в составе вагинально-цервикальной микробиоты в норме безоговорочно признается доминирующая роль молочнокислых бактерий. Согласно накопленной информации, в микробиоте влагалища может встречаться более десяти видов лактобактерий, состав, количество и функциональное состояние которых постоянно изменяются в зависимости от возраста, гормонального статуса, периода менструального цикла и других факторов. На основе молекулярно-генетических исследований установлено 6 типов вагинальной микробиоты, в 3–4-х из которых лактобактерии составляют более 90% микробного сообщества [Fudaba et al., 2021]. Вместе с тем публикации о влиянии БП микробного происхождения на представителей *Lactobacillus*, определяющих благополучие в биотопе, в доступной литературе немногочисленны, и преимущественно они посвящены изучению проблемы бактериального вагиноза [Sanderson, White, Balsdon, 1983; Nelson et al., 2015; Borgogna et al., 2021]. В работах J.C. Borgogna et al. показано, что минимальные ингибирующие концентрации путресцина и кадаверина, необходимые для подавления роста вагинальных штаммов *Lactobacillus* spp., превышают концентрации этих полиаминов, детектируемых при физиологических состояниях у женщин. Авторами установлено, что в максимальных концентрациях, которые были характерны для женщин с типом влагалищной микрофлоры CST IV, путресцин тормозит рост лактобацилл *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, увеличивая при этом время процесса деления их в среднем на 20–30%. Кадаверин в аналогичных концентрациях также увеличивает время деления и удлиняет лаг-фазу роста бактериальных популяций *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*. Более того, даже в физиологических концентрациях кадаверин и путресцин снижают продукцию молочной кислоты штаммами *L. iners* (*L*-изоформа) и *L. gasseri* (*D*- и *L*-изоформы). Авторами исследования отмечена интересная особенность, которая заключается в том, что вагинальные штаммы *L. iners* среди представителей других видов лактобактерий оказались менее подвержены негативному влиянию этих диаминов. Установлено, что удлинение лаг-фазы роста вагинальных штаммов лактобактерий под влиянием БП обуславливает переход микробиоты типа CST II в CST IV [Borgogna et al., 2021]. В исследованиях S. Puebla-Barragan et al. [2021] показано, что лактобактерии, предварительно инкубированные в присутствии полиаминов, обладали более выраженной способностью деградировать эти полимеры, а также наибольшей устойчивостью к высоким значениям pH и способностью расти в присутствии полиаминов. Такая ситуация может быть связана с тем, что активность основного фермента метаболизма путресцина и кадаверина – аргининдегидгеназы – у лактобактерий зависит от значения pH среды [Rimaux et al., 2011]. Вероятно, лактобактерии при низких значениях pH используют кадаверин и путресцин как источник нутриентов [Puebla-Barragan et al., 2021].

Цель исследования – оценить влияние биогенных полиаминов бактериального происхождения на функциональную активность клинических штаммов *Lactobacillus* spp.

Материалы и методы исследований

Образцы (15) цервико-вагинального отделяемого женщин репродуктивного возраста были получены при помощи стандартизованных по объему (0.1 мл) ложек Фолькмана. Лактобактерии изолировали на полужидкой молочно-ростовой среде (МРС), в ряде исследований для культивирования использовали Лактобакагар (Оболенск, Россия). Бактерии культивировали при температуре 37°C в обычных и микроаэрофильных условиях при повышенной влажности. Полученные чистые культуры идентифицировали с учетом тинкториальных и культурально-биохимических свойств. Штаммами сравнения служили *L. crispatus* LMG 9479, *L. acidophilus* LMG 8151, *L. brevis* LMG 27275, *L. plantarum* 8P-A3. Для изучения кинетики роста бактериальных клеток в питательную среду МРС, разлитую в лунки плоскодонного полистиролового планшета, вносили тест-штаммы и штаммы сравнения. Культивирование осуществляли в течение 72 ч. при 37°C. Каждый час проводили измерение оптической плотности при длине волны 580 нм на планшетном спектрофотометре PowerWave X (Bio-Tek). Интенсивность накопления бактериальной биомассы оценивали, рассчитывая площадь под кривыми роста с помощью программы Microsoft® Excel® (Microsoft, 2019).

Концентрацию полиаминов определяли с использованием разработанных в лаборатории адаптации микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН высокочувствительных флуоресцентных методов, основанных на тонкослойном разделении дансированных производных этих соединений [Лаврикова, Ахова, Ткаченко, 2020; Шегина, Ахова, Ткаченко, 2020] и методов высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и их обсуждение

При культивировании изолированных клинических штаммов *Lactobacillus* spp. в более чем в 90% случаев не установлено продукции ими путресцина и кадаверина, в остальных случаях продукцию этих полиаминов регистрировали лишь на следовом уровне.

При оценке влияния путресцина на кинетику роста штаммов *Lactobacillus* spp. установлено, что для клинических изолятов характерна короткая лаг-фаза, после которой бактериальные клетки переходили в фазу экспоненциального роста. Для штаммов сравнения зарегистрирована более длительная лаг-фаза (рис. 1). По завершении фазы экспоненциального роста уровень накопления биомассы различными штаммами существенно не различался.

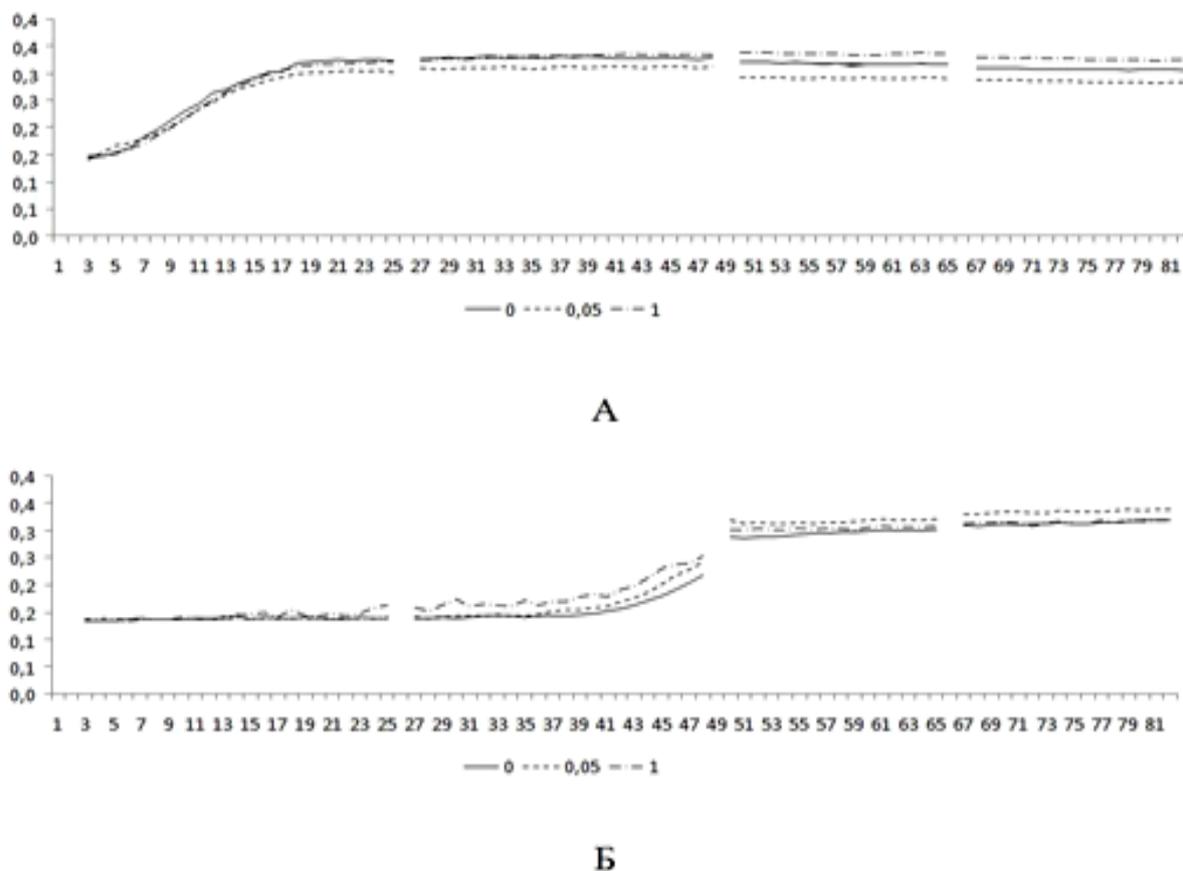


Рис. 1. Влияние путресцина на кинетику роста клинического штамма (А) и штамма сравнения (Б) *Lactobacillus* spp.

По оси абсцисс – длительность культивирования (час), по оси ординат – объем биомассы (усл. ед. оптической плотности). Линиями обозначены кривые роста при различных концентрациях путресцина (ммоль/л)

[The effect of putrescine on the growth kinetics of clinical strain (A) and comparison strain (Б) *Lactobacillus* spp. On the abscissa axis – the duration of cultivation (hour), on the ordinate axis – the volume of biomass (conl. units of optical density). The lines indicate the growth curves at different concentrations of putrescine (mmol/l)]

При концентрации путресцина 0.05 ммоль/л в среде культивирования клинических штаммов наблюдали относительно более низкий уровень накопления биомассы, чем у штаммов сравнения. Увеличение концентрации путресцина до 1 ммоль/л повышало биомассу клинических штаммов, а у штаммов сравнения лишь несколько ускоряло фазу экспоненциального роста, не влияя в дальнейшем на накопление биомассы.

Кадаверин в концентрации 1 ммоль/л в среде культивирования существенно увеличивал накопление биомассы как клинических штаммов, так и штаммов сравнения. Однако для штаммов сравнения после завершения фазы экспоненциального роста кривая совпадала с таковой для образцов, культивируемых без кадаверина (рис. 2).

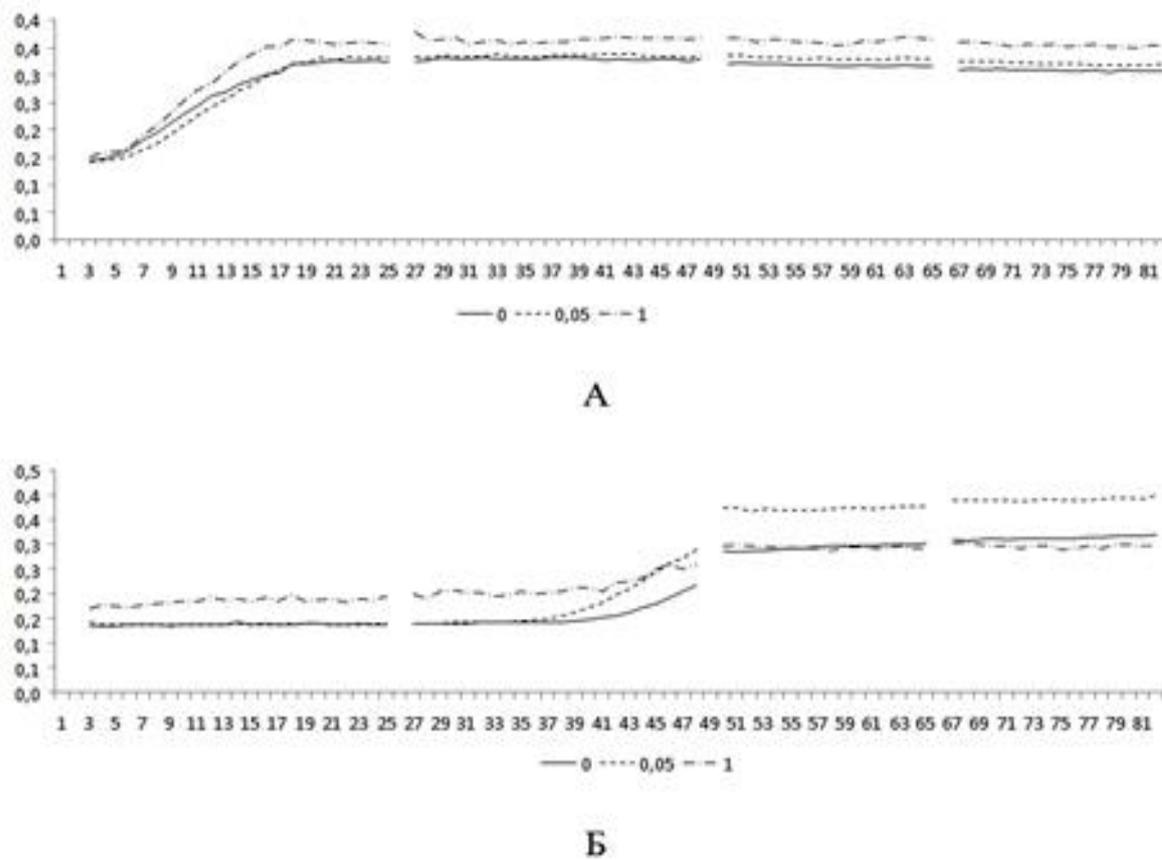


Рис. 1. Влияние кадаверина на кинетику роста клинического штамма (А) и штамма сравнения (Б) *Lactobacillus* spp.

По оси абсцисс – длительность культивирования (час), по оси ординат – объем биомассы (усл. ед. оптической плотности). Линиями обозначены кривые роста при различных концентрациях кадаверина (ммоль/л)

[The effect of cadaverine on the growth kinetics of clinical strain (A) and comparison strain (B) *Lactobacillus* spp.

On the abscissa axis – the duration of cultivation (hour), on the ordinate axis – the volume of biomass (concl. units of optical density). The lines indicate the growth curves at different concentrations of cadaverine (mmol/l)]

Заключение

В результате проведенных исследований установлено влияние бактериальных диаминов на ростовые характеристики клинических штаммов лактобактерий, изолированных из цервика-вагинального отделяемого женщин репродуктивного возраста. Ранее в работе [Borgogna et al., 2021] показано, что повышение содержания кадаверина, путресцина и тирамина в отделяемом влагалища было связано с большей вероятностью перехода женщин от вагинальной микробиоты с преобладанием *L. crispatus* к микробиоте с низким содержанием *Lactobacillus* spp. Авторы считают, что *in vivo* увеличение наиболее часто наблюдаемых бактериальных аминов связано с потерей *Lactobacillus* spp. Более того, БП бактериального происхождения негативно влияют на рост типовых штаммов наиболее распространенных вагинальных лактобацилл и изменяют их продукцию молочной кислоты. Полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что бактериальные амины дестабилизируют вагинальные *Lactobacillus* spp., играя при этом важную и непосредственную роль в ослаблении их защиты вагинальной микросреды. В исследовании Е. Kulev с соавт. [2012] показано, что лактобактерии стимулируют продукцию кадаверина и других полиаминов энтеробактериями, которые наиболее часто изолируют из цервика-вагинального биотопа при дисбиотических и неспецифических воспалительных процессах в генитальном тракте. Можно полагать, что при этом формируется «порочный круг»: *Lactobacillus* spp. стимулируют продукцию полиаминов энтеробактериями, в свою очередь, полиамины укорачивают продолжительность лаг-фазы лактобактерий, сохраняя им жизнеспособность, и способны существенно изменять видовой состав лактобацилл. Такой «порочный круг» можно рассматривать как патогенетическое звено хронизации воспалительного процесса.

Список источников

1. Лаврикова А.Л., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Продукция кадаверина бактериями в условиях микроаэрации // Химия. Экология. Урбанистика. 2020. Т. 2020-2. С. 122–125.
2. Нестерова Л.Ю., Цыганов И.В., Ткаченко А.Г. Влияние биогенных полиаминов на антибиотикочувствительность и поверхностные свойства клеток *Mycobacterium smegmatis* // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56, № 4. С. 342–351.
3. Ткаченко А.Г. и др. Роль полиаминов в регуляции бактериальной персистенции // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. 2020. № 2. С. 36–47.
4. Шегина Е.С., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Продукция путресцина бактериями в условиях микроаэрации // Химия. Экология. Урбанистика. 2020. Т. 2020-2. С. 216–220.
5. Borgogna J.C. et al. Biogenic amines increase the odds of bacterial vaginosis and affect the growth of and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus* spp. // Appl. Environ. Microbiol. 2021. Vol. 87(10). Article e03068-20. DOI: 10.1128/AEM.03068-20.
6. Fudaba M. et al. Bioinformatics analysis of oral, vaginal, and rectal microbial profiles during pregnancy: A pilot study on the bacterial co-residence in pregnant women // Microorganisms. 2021. Vol. 9(5). Article 1027. DOI: 10.3390/microorganisms9051027.
7. Kuley E. et al. Stimulation of cadaverine production by foodborne pathogens in the presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* spp. // J. Food Sci. 2012. Vol. 77(12). Article M650-8. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02825.x.
8. Nelson T.M. et al. Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis? // Front. Physiol. 2015. Vol. 6. Article 253. DOI: 10.3389/fphys.2015.00253.
9. Puebla-Barragan S. et al. Interstrain variability of human vaginal *Lactobacillus crispatus* for metabolism of biogenic amines and antimicrobial activity against urogenital pathogens // Molecules. 2021. Vol. 26(15). Article 4538. DOI: 10.3390/molecules26154538.
10. Puebla-Barragan S. et al. The two-way interaction between the molecules that cause vaginal malodour and lactobacilli: An opportunity for probiotics // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22(22). Article 12279. DOI: 10.3390/ijms222212279.
11. Rimaux T. et al. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent // Food Microbiol. 2011. Vol. 28(3). P. 597–604. DOI: 10.1016/j.fm.2010.11.016.
12. Sanderson B.E., White E., Balsdon M.J. Amine content of vaginal fluid from patients with trichomoniasis and gardnerella associated nonspecific vaginitis // Br. J. Vener Dis. 1983. Vol. 59. P. 302–305.

References

1. Lavrikova A.L., Ahova A.V., Tkachenko A.G. [Production of cadaverine by bacteria under microaeration conditions]. *Chimija. Ėkologija. Urbanistika*. V. 2020-2 (2020): pp. 122-125.
2. Nesterova L.Ju., Cyganov I.V., Tkachenko A.G. [Effect of biogenic polyamines on antibiotic sensitivity and surface properties of *Mycobacterium smegmatis* cells]. *Prikladnaja biochimija i mikrobiologija*. V. 56, No 4 (2020): pp. 342-351. (In Russ.).
3. Tkachenko A.G., Haova E.A., Kashevarova N.M., Nesterova L.Ju., Ahova A.V., Sidorov R.Ju., Cyganov I.V. [The role of polyamines in the regulation of bacterial persistence]. *Vestnik Permskogo federal'nogo issledovatel'skogo centra*. No 2 (2020): pp. 36-47. (In Russ.).
4. Shegina E.S., Ahova A.V., Tkachenko A.G. [Putrescine production by bacteria under microaeration conditions]. *Chimija. Ėkologija. Urbanistika*. V. 2020-2 (2020): pp. 216-220. (In Russ.).
5. Borgogna J.C., Shardell M.D., Grace S.G., Santori E.K., Americus B., Li Z., Ulanov A., Forney L., Nelson T.M., Brotman R.M., Ravel J., Yeoman C.J. Biogenic amines increase the odds of bacterial vaginosis and affect the growth of and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 87(10) (2021): Article e03068-20. DOI: 10.1128/AEM.03068-20.
6. Fudaba M., Kamiya T., Tachibana D., Koyama M., Ohtani N. Bioinformatics analysis of oral, vaginal, and rectal microbial profiles during pregnancy: A pilot study on the bacterial co-residence in pregnant women. *Microorganisms*. V. 9(5) (2021): Article 1027. DOI: 10.3390/microorganisms9051027.
7. Kuley E., Balıkcı E., Özoğul I., Gökdoğan S., Özoğul F. Stimulation of cadaverine production by foodborne pathogens in the presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* spp. *J. Food Sci.* V. 77(12) (2012): Article M650-8. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02825.x.
8. Nelson T.M., Borgogna J.-C., Brotman R.M., Ravel J., Walk S.T., Yeoman C.J. Vaginal biogenic amines: biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis? *Front. Physiol.* V. 6 (2015): Article 253. DOI: 10.3389/fphys.2015.00253.
9. Puebla-Barragan S., Watson E., van der Veer C., Chmiel J.A., Carr C., Burton J.P., Sumarah M., Kort R., Reid G. Interstrain variability of human vaginal *Lactobacillus crispatus* for metabolism of biogenic amines and

antimicrobial activity against urogenital pathogens. *Molecules*. V. 26(15) (2021): Article 4538. DOI: 10.3390/molecules26154538.

10. Puebla-Barragan S., Akouris P.P., Al K.F., Carr C., Lamb B., Sumarah M., van der Veer C., Kort R., Burton J., Reid G. The two-way interaction between the molecules that cause vaginal malodour and lactobacilli: An opportunity for probiotics. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22(22) (2021): Article 12279. DOI: 10.3390/ijms222212279.

11. Rimaux T., Vrancken G., Pothakos V., Maes D., De Vuyst L., Leroy F. The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiol.* V. 28(3) (2011): pp. 597-604. DOI: 10.1016/j.fm.2010.11.016.

12. Sanderson B.E., White E., Balsdon M.J. Amine content of vaginal fluid from patients with trichomoniasis and gardnerella associated nonspecific vaginitis. *Br. J. Vener Dis.* V. 59 (1983): pp. 302-305.

Статья поступила в редакцию 22.08.2022; одобрена после рецензирования 09.09.2022; принята к публикации 29.09.2022.

The article was submitted 22.08.2022; approved after reviewing 09.09.2022; accepted for publication 29.09.2022.

Информация об авторах

Е. В. Афанасьевская – канд. мед. наук, доцент;

А. П. Годовалов – канд. мед. наук, доцент;

Т. И Карпунина – д-р биол. наук, профессор.

Information about the authors

E. V. Afanasevskaia – candidate of medicine, associate professor;

A. P. Godovalov – candidate of medicine, associate professor;

T. I. Karpunina – doctor of biology, professor, head of department.

Вклад авторов:

Афанасьевская Е. В. – сбор и лабораторный анализ материала.

Годовалов А. П. – статистическая обработка данных, написание исходного текста.

Карпунина Т. И. – научное руководство, концепция исследования, итоговые выводы.

Contribution of the authors:

Afanasevskaia E. V. – collection and laboratory analysis of the material.

Godovalov A. P. – writing the draft, statistical processing.

Karpunina T. I. – scientific management, research concept, conclusions.