

2-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 2
BIOTECHNOLOGY

Раздел 2
БИОТЕХНОЛОГИЯ

**Айтжанова А.А.¹, Саубенова М.Г.¹, Мунье Дж.²,
Олейникова Е.А.¹, Бержанова Р.Ж.³**

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: aida_91_20@mail.ru

²Университет Западной Бретани, Университетская лаборатория биоразнообразия
и микробной экологии, F-29280 Плузане

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ КАЗАХСКИХ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ С АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ДРОЖЖЕЙ РОДА *CANDIDA*

Рост числа кандидозов, повышение степени их тяжести и возрастающая устойчивость возбудителей к противогрибковым препаратам, а также их вредные побочные эффекты, вызывают необходимость выявления новых более эффективных и безопасных противогрибковых средств. В этом контексте большой интерес может представлять разработка и использование функциональных кисломолочных продуктов с микроорганизмами, обладающими противогрибковой активностью и способствующими выведению из организма оппортунистических дрожжей рода *Candida*. Микробиота казахских национальных кисломолочных напитков, полученных из кобыльего и верблюжьего молока, оказывает разностороннее воздействие на здоровье человека, но антагонистическая активность представителей этой микробиоты против видов дрожжей, ответственных за кандидоз, еще не изучена.

Целью настоящей работы было выделение из казахских национальных кисломолочных напитков микроорганизмов, антагонистически активных в отношении дрожжей рода *Candida*.

Исследование антагонистической активности различных образцов молочных и кисломолочных продуктов местного (как домашнего, так и коммерческого) производства в отношении *S. albicans* методом диффузии из лунок показало эффективное подавление роста дрожжей образцами кумыса домашнего изготовления. Ассоциации микроорганизмов различных образцов кумыса сохраняли антагонистическую активность при последовательных пересевах на коровьем молоке и молочной сыворотке. При культивировании на коровьем молоке эти ассоциации обладали повышенной активностью в отношении *S. krusei* 25. Наиболее высокую антагонистическую активность в отношении *S. glabrata* 589 проявили три ассоциации при культивировании на молочной сыворотке. После высева наиболее перспективных ассоциаций на среду MRS из колоний различных морфологических типов выделен 41 изолят бактерий, 28 из которых являются молочнокислыми бактериями, а остальные, предположительно, уксуснокислыми микроорганизмами. Выделено также 34 изолята дрожжей.

В наших исследованиях впервые выделены аборигенные штаммы молочнокислых микроорганизмов, ингибирующие рост дрожжей рода *Candida*, в том числе проявляющих высокую степень устойчивости, как к метаболитам молочнокислых бактерий (кишечные и вагинальные изоляты *S. albicans*), так и к противогрибковым антибиотикам (*S. glabrata* 589 и *S. krusei* 25). Отобранные микроорганизмы будут использованы для создания консорциумов и использования в качестве заквасок для функциональных напитков с противогрибковой активностью в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida*.

Ключевые слова/словосочетания: кумыс, молочнокислые бактерии, анти-*Candida*. активность

Aitzhanova A.A.¹, Saubenova M.G.¹, Mounier J.², Oleinikova E.A.¹, Berzhanova R.Zh.³

¹LLP "Scientific Production Center of Microbiology and Virology", Kazakhstan, Almaty, e-mail: aida_91_20@mail.ru

²Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280 Plouzan, France

³Kazakh National University named after al-Farabi (MES RK), Kazakhstan, Almaty

Isolation of microorganisms from Kazakh dairy products with antagonistic activity against yeast species from the *Candida* genus

An increase in the number of severe candidiasis, the growing incidence of antimicrobial resistance of the pathogens responsible for these infections, as well as their harmful side effects, necessitate developing new and more effective antifungal agents. In this context, the elaboration and utilization of functional fermented milk products with microorganisms harbouring antifungal activity and thus promoting the elimination of opportunistic *Candida* yeasts from the body, could be of great interest. The microbiota of Kazakh national sour-milk beverages derived from mare's and camel's milk has a multidirectional health effect on the human body, but the antagonistic activity of members of these microbiota against yeast species responsible for candidiasis have not yet been studied.

The aim of this work was to isolate microorganisms, with antagonistic activity against *Candida* yeast species from Kazakh national fermented milk beverages.

The study of antagonistic activities of various dairy products of local (both domestic and commercial) production against *C. albicans* using well-diffusion assays showed effective suppression of yeast growth with homemade koumiss samples. Associations of microorganisms from various koumiss samples also showed antagonistic activities after performing successive inoculations and fermentations of cow's milk and whey. When cultured in cow's milk, these associations had an increased activity against *C. krusei* 25. The highest antagonistic activity against *C. glabrata* 589 was found for three associations cultured in whey. After plating the most promising associations on MRS media, 41 bacteria with were isolated from selected associations based on their colony morphotype, 28 of which were lactic acid bacteria, while the other were presumptive acetic bacteria. Thirty-four yeast isolates were also selected.

In the present study, autochthonous strains of microorganisms that inhibited *Candida* spp. growth, including *Candida* strains exhibiting a high resistance to both lactic acid bacteria metabolites (intestinal and vaginal isolates of *C. albicans*) and antifungal antibiotic fluconazole (*C. glabrata* 589 and *S. krusei* 25), were selected for the first time. The isolated microorganisms will be used to create consortia and apply as starters to develop new functional beverages with antifungal activity against opportunistic *Candida* yeast species.

Key words: koumiss, lactic acid bacteria, *Candida* yeast antagonists.

Айтжанова А.А.¹, Саубенова М.Г.¹, Мунье Дж.², Олейникова Е.А.¹, Бержанова Р.Ж.³

¹«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы», ЖШС,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: aida_91_20@mail.ru

²Вест-Британи Университеті, Университеттің биоалуантүрлілік және
микробтық экология зертханасы, F-29280 Плузане

³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (ҚР БҒМҚ), Қазақстан, Алматы қ.

Қазақстандық сүт қышқылды өнімдерден *Candida* туысы ашытқыларына қатысты антагонистік белсенділік көрсететін микроорганизмдерді бөліп алу

Кандидоздар санының өсуі, олардың ауырлық дәрежесінің жоғарылауы және қоздырғыштардың саңырауқұлаққа қарсы препараттарға төзімділігінің артуы, сонымен қатар, олардың зиянды жанама әсері, жаңа тиімдірек және қауіпсіз саңырауқұлаққа қарсы заттарды анықтауды қажет етеді. Бұл тұрғыда саңырауқұлаққа қарсы белсенділік көрсететін және *Candida* оппортунистикалық ашытқыларын ағздан шығаратын қасиетке ие микроорганизмдер бар функционалды сүтқышқылды өнімдерді дайындауға және пайдалануға көп қызығушылық туындауда. Жылқы және түйе сүтінен дайындалған қазақстандық сүт қышқылды сусындардың микробиотасы адам денсаулығына әр түрлі әсер етеді, бірақ бұл микробиотаның өкілдеріне кандидозға жауапты ашытқы түрлеріне қарсы әрекеті әлі зерттелмеген.

Ағздағы *Candida* шартты патогенді ашытқыларды жоюға ықпал ететін саңырауқұлақтарға қарсы белсенділігі бар функционалды сүт қышқылды өнімдерді құрастырғанда, олардың табиғи антагонисттерін пайдаланған дұрыс. Жылқы және түйе сүтінің негізінде жасалған қазақтың ұлттық сүт сусындарының микрофлорасы адам ағзасына көп жақты сауықтыру әсеріне, алайда оның өкілдері *Candida* туысы ашытқыларына антагонистері ретінде зерттелмеген.

Бұл жұмыстың мақсаты – қазақстандық сүт қышқыл сусындардан *Candida* туысы ашытқыларына қатысты антагонистік белсенді микроорганизмдерді бөліп алу.

Жергілікті өндірістің (отандық, сондай-ақ коммерциялық) сүт және сүт өнімдерінің әртүрлі үлгілерінің *C. albicans*-қа қатысты антагонистік белсенділігін ұңғымадан диффузия әдісімен

зерттеу нәтижесінде, үй қымызы үлгілері ашытқының өсуін тиімді тоқтатқанын көрсетті. Өртүрлі қымыз үлгілерінің микроорганизмдерінің ассоциациясы сиыр сүтіне және сүт сарысуына жүйелі егу кезінде антагонистік белсенділігін сақтап қалды. Сиыр сүтінде өсірген кезде, бұл ассоциациялар *C. krusei* 25 қатысты жоғары белсенділік көрсетті. *C. glabrata* 589-ға қарсы неғұрлым жоғары антагонистік белсенділікті сарысуда өсіру кезінде үш ассоциация көрсетті. Ең перспективалық ассоциацияларды MRS қоректік ортасына еккеннен кейін, колониялардың өртүрлі морфологиялық түрлерінен 41 бактериялар изоляттары бөлініп алынды, олардың 28-і сүт қышқылды бактериялар, ал қалғандары, шамамен, сірке қышқылы микроорганизмдері болып табылады. Сондай-ақ, 34 ашытқы изоляттары бөлінді.

Біздің зерттеулерде алғашқы *Candida* туысы ашытқыларының өсуін тежейтін, сонымен бірге, сүт қышқылды бактериялардың метаболиттеріне (*C. albicans* ішек және қынап изоляттары), сондай-ақ саңырауқұлақтарға қарсы антибиотиктерге (*C. glabrata* 589 және *C. krusei* 25) тұрақтылықтың жоғары дәрежесін көрсететін сүт қышқылды микроорганизмдердің байырғы штамдары бөлініп алынды. Таңдалып алынған микроорганизмдер консорциумдарын жасауға *Candida* туысы ашытқыларына қатысты саңырауқұлақтарға қарсы белсенділікке ие, функционалды сусындарға ашытқы ретінде қолданылады.

Түйін сөздер: қымыз, сүт қышқылы бактериялар, *Candida*-ға қарсы белсенділік

Введение

Дрожжи рода *Candida* в норме относятся к комменсальным представителям микрофлоры кожной и слизистой поверхностей человека, их находят в кале – у 65 – 80% населения стран Европы [1, 2]. Любое нарушение в окружающей среде может способствовать возникновению поверхностных форм кандидоза (полости рта, пищевода, вульвы и влагалища), протекающих с поражением слизистых оболочек, и их количество постоянно растет [3, 4]. В условиях иммунной дисфункции человека и усиленного размножения дрожжей, происходит их вторжение в кровоток, инфицирование разных органов и формирование широкого спектра тяжелых заболеваний вплоть до летального исхода [5].

Наиболее экологически обоснованным способом контроля патогенных микроорганизмов является привлечение их естественных антагонистов. Общеизвестными антагонистами грибов являются молочнокислые бактерии, подкисляющие среду и продуцирующие некоторые вторичные метаболиты, увеличивающие пищевую и биологическую ценность, а также сохранность ферментированных пищевых продуктов [6-11]. Большинство штаммов рода *Lactobacillus* способствуют укреплению здоровья человека и животных, вступая в полезные взаимоотношения с кишечной микробиотой [12, 13].

Рост числа заболеваний кандидомикозами с летальным исходом, возрастающая устойчивость их возбудителей к противогрибковым препаратам, а также их вредные побочные эффекты, вызывают необходимость выявления новых более эффективных противогрибковых средств, в том числе на основе натуральных продуктов.

С использованием *Lactobacillus* уже получены пробиотики, обосновывающие их полезность в качестве дополнительного терапевтического воздействия против кандидозных инфекций слизистых оболочек [14-18]. Молочнокислые микроорганизмы, входящие в пробиотики, выгодно отличаются от химических противогрибковых препаратов тем, что они не только конкурируют с патогенами за питательные вещества и рецепторы, предотвращая вредное воздействие патогенов и продуцируя бактериоцины, перекись водорода, органические кислоты, пептиды и другие белковые соединения, но также участвуют в модуляции иммунного ответа посредством увеличения неспецифической фагоцитарной активности [19, 20].

Большое разнообразие продуктов метаболизма, проявляющих противогрибковый эффект, равно как и другие полезные свойства этих бактерий, требует более углубленного их изучения, а главное, выделения новых штаммов-продуцентов [21-23]. Микрофлора казахских национальных кисломолочных напитков, оказывающих оздоровительное воздействие на организм человека, привлекает пристальный интерес [24-29], однако, как антагонисты дрожжей рода *Candida* ее представители исследованы не были.

В нашей предыдущей работе была показана зависимость обнаружения противогрибковой активности молочнокислых бактерий от используемого метода [30]. Наиболее часто выявляется противогрибковая активность молочнокислых бактерий при использовании метода агаровых слоев. Метод двухслойного агара традиционно используется для скрининга противогрибковых соединений молочнокислых бактерий и хорошо подходит для обнаружения их в надосадочных

жидкостях [11, 21, 31, 32]. Однако он не предполагает наличие клеточного контакта между штаммами антагониста и тестовой культуры и является менее пригодным для отбора микроорганизмов пробиотиков, чем метод диффузии из лунок. Особую важность при отборе антагонистически активных молочнокислых бактерий клеточный контакт между условно-патогенными дрожжами и тестируемыми микроорганизмами приобретает в связи с данными об инверсии антагонизма ряда микроорганизмов, в том числе молочнокислых бактерий, компонентами грибковых клеточных стенок, особенно дрожжей рода *Candida* [33].

Ранее нами были отобраны молочнокислые бактерии из казахских национальных напитков шубат и кумыс. Однако антагонистическая активность чистых культур выделенных микроорганизмов в отношении *C. albicans* не сохранялась при их поддержании и хранении на коровьем молоке и среде MRS (de Man, Rogosa and Sharpe).

Целью настоящей работы было выделение потенциально пробиотических микроорганизмов, проявляющих антагонизм в отношении дрожжей *C. albicans*, для создания активных заквасок для получения функциональных напитков с направленным противогрибковым действием, способствующих элиминации из организма человека дрожжей рода *Candida*. Представляла интерес также возможность выявления микроорганизмов, антагонистически активных в отношении устойчивых к флуконазолу вагинальных изолятов дрожжей *C. krusei* и *C. glabrata*. Для этого предполагалось провести предварительный отбор кисломолочных продуктов, микрофлора которых обладает антагонистической активностью в отношении условно-патогенных дрожжей рода *Candida* и сохраняет ее при последовательных пересевах на молоке и молочной сыворотке.

Материалы и методы исследования

Для выделения молочнокислых микроорганизмов отобрано 24 образца домашнего молока, сливок, сметаны, катыка, кефира, кумыса и шубата от различных производителей Алматинской области Республики Казахстан.

Образцы продуктов предварительно проверяли на наличие антагонистической активности в отношении *C. albicans*. Для этого в предварительно расплавленную и охлажденную до 45°C питательную среду Сабура (г/л: глюкоза 40,0; пептон 10,0; агар-агар 18,0) вносили суспен-

зию тестовой культуры дрожжей, содержащей 1×10^5 КОЕ/мл, в количестве 1 мл на каждые 100 мл среды. Среду разливали по 25 мл на чашку Петри. После застывания среды на газоне тестовой культуры готовили лунки диаметром 10 мм. В каждую лунку вносили по 0,3 мл продукта. Чашки помещали в термостат при 37°C, инкубировали в течение 2 суток. О наличии антагонистической активности судили по наличию зон подавления роста дрожжей вокруг лунок [34].

Тест-культурами служили штаммы дрожжей *C. albicans*, ранее отобраные как наиболее устойчивые к антагонистическому воздействию молочнокислых бактерий среди имеющихся в коллекции микроорганизмов: кишечный изолят *C. albicans* 13К, вагинальный изолят *C. albicans* 514В, а также устойчивые к флуконазолу вагинальные изоляты дрожжей *C. krusei* 25 и *C. glabrata* 589.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов исследований производили по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента [35]. Уровень значимости $p < 0,05$.

Продукты, проявившие антагонистическую активность в отношении *C. albicans*, подвергали серии ежедневных пересевов на коровьем молоке (жирн. 1,5%) и молочной сыворотке с регулярным (через 1, 3 и 5 суток) определением противогрибковой активности в отношении условно-патогенных дрожжей. Температура культивирования 37°C. Всего проведено 5 пассажей.

Из антагонистически активных при культивировании на коровьем молоке и молочной сыворотке консорциумов выделяли молочнокислые микроорганизмы высевом на плотную среду MRS из серии десятикратных разведений. Посевы инкубировали в течение 2-3 суток при температуре 37°C.

Культуры отбирали из колоний различных морфологических типов. Грам принадлежность отобранных бактерий выявляли с помощью теста Грегерсона [36]. Каталазную активность определяли по реакции с перекисью водорода. Морфологию клеток изучали на тринокулярном микроскопе LEICA DMLS с цифровой камерой LEICA DC 300F. Свертывание молока изучали инкубированием в молоке при 37°C.

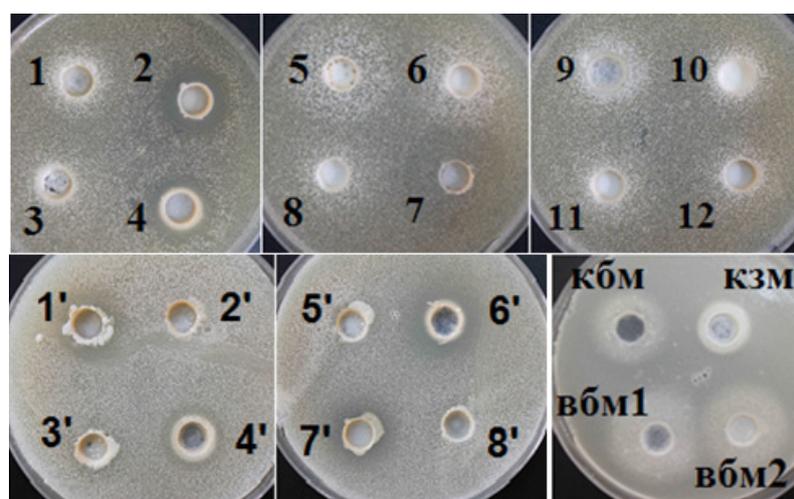
Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании влияния казахских национальных напитков, а также проб коровьего

молока, сливок, сметаны, катыка и кефира, на рост дрожжей *C. albicans* была подтверждена ранее нами установленная [30] стимуляция условно-патогенных дрожжей молочными и кисломолочными продуктами, что выразалось в их более активном росте вокруг лунок с внесенным продуктом, чем на остальном газоне. Эффект

может быть связан с использованием дрожжами в качестве дополнительного источника углерода лактозы и молочной кислоты.

Исключение составили образцы кумыса от различных изготовителей, которые обычно в той или иной степени подавляли рост дрожжей вокруг лунок (Рисунок 1).



1 – коровье молоко; 2 – кумыс I; 3 – шубат I; 4 – кумыс II; 5 – шубат II; 6 – шубат заводской; 7 – кумыс заводской I; 8 – катык; 9 – сметана; 10 – сливки; 11 – кефир заводской I; 12 – кефир заводской II; 1' – кумыс (кымызхана I); 2' – шубат (кымызхана I); 3' – кумыс III; 4' – кумыс (кымызхана II); 5' – шубат III; 6' – кумыс IV; 7' – кумыс V; 8' – кумыс заводской II; КБМ – кобылье молоко; КЗМ – козье молоко; ВБМ1 – верблюжье молоко 1; ВБМ2 – верблюжье молоко 2

Рисунок 1 – Влияние молочных и кисломолочных продуктов на рост кишечного изолята дрожжей *C. albicans* 13К

Заводские образцы кумыса обладали меньшей активностью по сравнению с домашним кумысом. Шубат в данном исследовании не проявил антагонистической активности в отношении *C. albicans*. Коровье, козье, кобылье, верблюжье молоко, сливки, сметана, катык и кефир стимулировали рост тест культуры вокруг лунок.

Образцы кумыса №№ 2, 4, 1', 6' и 7' были отобраны для дальнейшей работы. Их подвергали серии пересевов на коровьем молоке и молочной сыворотке с целью создания в дальнейшем функциональных напитков на основе сыворотки.

Было показано (Таблица 1), что антагонистическая активность в отношении дрожжей рода *Candida* сохраняется при последовательных пересевах на коровьем молоке и молочной сыворотке, хотя и снижается у некоторых консорциумов.

Степень подавления условно-патогенных дрожжей отобранными ассоциациями зависела от тестового штамма. В целом противогрибковая активность в отношении кишечного изолята *C. albicans* 13К была выше при первом пассаже ассоциаций кумыса на коровьем молоке предположительно вследствие сохранения влияния химического состава кобыльего молока на рост микроорганизмов и продукцию ими антагонистически активных веществ. При пересевах антагонизм ассоциаций снижался.

Адаптация ассоциаций к новой среде в целом способствовала повышению антагонизма относительно вагинального изолята *C. albicans* 514В. В наибольшей степени возростала противогрибковая активность у ассоциаций №1 и №4. Указанные различия могут свидетельствовать о различии действующих веществ и механизмов подавления различных штаммов дрожжей.

Таблица 1 – Антагонистическая активность консорциумов молочнокислых микроорганизмов в отношении условно-патогенных дрожжей *C. albicans* (мм)

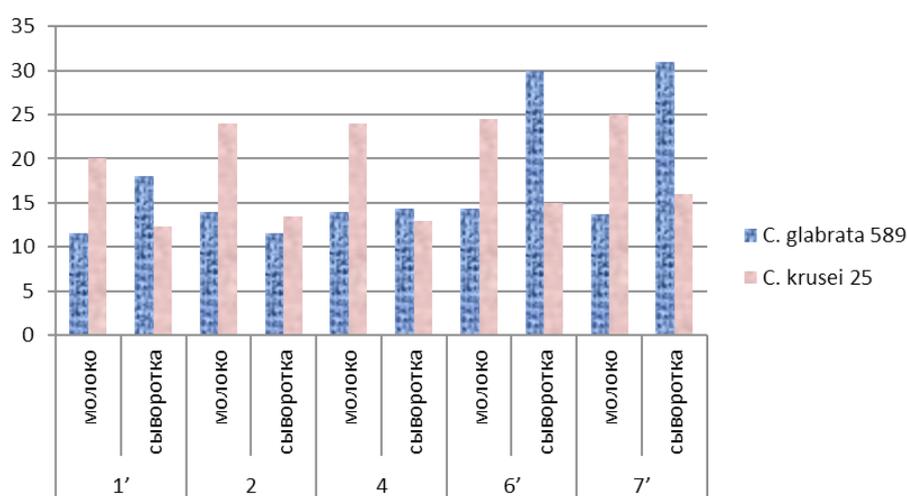
№	Среда	<i>C. albicans</i> 13K			<i>C. albicans</i> 514B		
		1 пассаж	3 пассаж	5 пассаж	1 пассаж	3 пассаж	5 пассаж
1'	молоко	17,3±0,3	22,0±0,2	16,0±1,0	10,5±0,5	17,0±0,5	15,0±0,5
	сыворотка	25,0±0,2	19,3±0,3	14,3±0,7	10,5±0,3	10,5±0,4	19,0±0,5
2	молоко	24,2±0,4	15,0±1,0	17,0±0,4	26,0±1,0	15,3±0,7	18,2±0,3
	сыворотка	24,3±0,7	17,1±0,4	10,5±0,5	14,0±1,0	15,0±0,5	16,3±0,3
4	молоко	25,0±0,1	13,0±0,1	18,0±0,1	18,0±0,1	13,0±1,0	14,0±0,1
	сыворотка	22,0±0,1	18,0±0,1	17,0±0,1	10,5±0,1	19,2±0,1	20,0±0,1
6'	молоко	20,5±0,5	21,0±0,1	13,3±0,3	13,0±0,1	18,0±0,3	16,3±0,7
	сыворотка	18,0±0,2	16,5±0,3	16,0±0,7	16,3±0,3	18,0±1,0	15,0±0,5
7'	молоко	21,0±0,2	21,0±0,1	14,1±0,2	15,0±0,5	17,1±0,3	17,0±0,3
	сыворотка	19,0±0,5	21,0±0,4	20,3±0,3	22,0±1,0	17,3±0,7	16,0±0,3

После серии пересевов на молоке и сыворотке ассоциации были проверены на антагонистическую активность в отношении вагинальных штаммов дрожжей *C. krusei* 25 и *C. glabrata* 589, устойчивых к флуконазолу, антагонисты в отношении которых не были ранее выявлены среди коллекционных молочнокислых бактерий (Рисунок 2).

Было выявлено, что все ассоциации при культивировании на коровьем молоке обладают повышенной активностью в отношении *C. krusei* 25. Наиболее высокую антагонистическую ак-

тивность в отношении *C. glabrata* 589 проявили ассоциации 1', 6' и 7' при культивировании на молочной сыворотке. Полученные данные

Из всех ассоциаций были отобраны микроорганизмы для дальнейшего исследования. На среде MRS был выявлен рост грамположительных каталазонегативных колоний, грамотрицательных каталазоположительных колоний, а также различных видов дрожжей. Морфология колоний микроорганизмов ассоциаций кумыса на среде MRS представлена на рисунке 3.



ось абсцисс – диаметр зон подавления роста дрожжей (мм); ось ординат – ассоциации

Рисунок 2 – Антагонистическая активность ассоциаций молочнокислых микроорганизмов в отношении флуконазол-устойчивых дрожжей *C. krusei* 25 и *C. glabrata* 589



Рисунок 3 – Морфология колоний бактериальных и дрожжевых микроорганизмов ассоциаций кумыса, антагонистически активных в отношении *C. albicans*

Всего выделен 41 изолят бактерий и 34 изолята дрожжей. 28 бактерий грамположительны и каталазонегативны, подкисляют молоко, то есть являются молочнокислыми микроорганизмами. Среди них преобладают палочки, расположенные обычно одиночно попарно и в цепочках различной длины. Выделено всего 4 кокковых микроорганизма. Каталазопозитивные грамотрицательные бактерии, вероятно, относятся к уксуснокислым бактериям, наличие которых в кумысе показано рядом авторов [25, 27-28].

Среди дрожжевых микроорганизмов выявлено несколько морфологических типов колоний. Все дрожжи образуют аскоспоры. Образование мицелия и псевдомицелия не выявлено, несмотря на вращение в агаризованную среду колоний значительной части изолятов.

Заключение

С целью разработки функциональных кисломолочных продуктов с направленным противогрибковым действием, способствующим элиминации из организма человека дрожжей рода *Candida*, была исследована микрофлора молочных продуктов местного производства на предмет выявления молочнокислых бактерий-антагонистов. Предварительная проверка продуктов на наличие антагонистической активности позволила определить наиболее активные

образцы кумыса для выделения антагонистов *Candida*. Наибольшей противогрибковой активностью обладали образцы кумыса домашнего изготовления. Выявленная антагонистическая активность сохранялась при пересевах ассоциаций микроорганизмов кумыса, как на молоке, так и на молочной сыворотке. Культивирование ассоциаций на двух средах позволило получить ассоциации, проявляющие активность в отношении флуконазол-устойчивых штаммов дрожжей *C. krusei* 25 и *C. glabrata* 589. Из различных образцов кумыса выделено 28 молочнокислых бактерий и 34 изолята дрожжей, которые будут использованы в дальнейшей работе для создания консорциумов и разработки на их основе напитков способствующих элиминации дрожжей рода *Candida* из пищеварительного тракта человека. Получены новые данные об анти-*Candida* активности естественных консорциумов казахского национального напитка кумыса.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках проекта AP05132352, финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов

Авторы не имеют конфликтов интересов.

Литература

- 1 Шевяков М.А. Диагностика и лечение кандидоза кишечника // *Терапевтический архив*, 2003, №11. – С. 77-79.
- 2 Gouba N., Drancourt M. Digestive tract mycobiota: A source of infection // *Médecine et maladies infectieuses*. – 2015. – Vol. 45. – P. 9–16.
- 3 Coogan M.M., Fidel P.L., Komesu M.C., Maeda L.P. Candida and mycotic infections // *Adv. Dent. Res.* – 2006. – Vol. 19. – P. 130-138.
- 4 Clark T. A., Hajjeh R. A. Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002. – Vol. 15. – P. 569–574.
- 5 Segal E. Candida, still number one – what do we know and where are we going from there? // *Mycoses*. – 2005. – Vol. 48, Issue s1. – P. 3-11.
- 6 Jyoti B., Suresh A.K., Venkatesh K. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates // *World J Microbiol Biotechnol.* – 2003. – Vol. 19. – P. 509–515.
- 7 Lanciotti R., Patrignani F., Bagnolini F., Guerzoni M.E., Gardini F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* // *Food Microbiol.* – 2003. – Vol. 20. – P. 537–543.
- 8 Schnürer, J., Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives // *Trends Food Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 16. – P. 70–78.
- 9 Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review // *Food Control*. – 2010. – Vol. 21. – P. 370–380.
- 10 Crowley S., Mahony, J., van Sinderen D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives // *Trends Food Sci. Technol.* – 2013. – Vol. 33. – P. 93–109.
- 11 Le Lay C., Coton E., Le Blay G., Chobert J. M., Haertlé Th., Choiset Y., Van Long N. N., Meslet-Cladière L., Mounier J. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria // *International Journal of Food Microbiology*. – 2016. – Vol. 239. – P. 79-85.
- 12 Pothuraju R., Sharma R.K. Interplay of gut microbiota, probiotics in obesity: a review // *Endocrine, metabolic and immune disorders-drug targets*. – 2018. – Vol. 18. – P. 212–220.
- 13 Vijayaram S., Kannan S. Probiotics: the marvelous factor and health benefits // *Biomed Biotechnol Res J.* – 2018. – Vol. 2. – P. 1–8.
- 14 Wagner R.D., Johnson S.J. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans* // *J Biomed Sci.* – 2012. – Vol. 19. – P. 58.
- 15 Ranadheera C.S., Evans C. A., Adams M. C., Baines S. K. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion // *J Funct Foods*. – 2014. – Vol. 8. – P. 18–25.
- 16 Matsubara V. H., Wang Y., Bandara H. M., Mayer M. P., Samaranayake L. P. Probiotic *Lactobacilli* inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016. – Vol. 100(14). – P. 6415-6426.
- 17 Tan Y., Leonhard M., Moser D., Ma S., Schneider-Stickler B. Inhibitory effect of probiotic *Lactobacilli* supernatants on single and mixed non-albicans *Candida* species biofilm // *Archives of Oral Biology*. – 2018. – Vol. 85. – P. 40-45.
- 18 Aartia Ch., Khusroa A., Vargheseb R., Arasuc M. V., Agastiana P., Al-Dhabic N. A., Ilavenild S., Choid K. Ch. // In vitro investigation on probiotic, anti-Candida, and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1 // *Archives of Oral Biology*. – 2018. – Vol. 89. – P. 99-106.
- 19 Cross M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic *Lactobacilli* and their role in protection against microbial pathogens // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2002. – Vol. 34, Issue 4. – P. 245-253.
- 20 Kanmani P., Kumar R. S., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V., Arul V. Probiotics and its functionally valuable products-a review // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2013. – Vol. 53. – P. 641e658.
- 21 Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period // *Int J Food Microbiol.* – 2012. – Vol. 155(3). – P.185-190.
- 22 Song Y. G., Lee S. H. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface // *Arch Oral Biol.* – 2017. – Vol. 76. – P. 1-6.
- 23 Prabhurajeshwar C., Chandrakanth R.K. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: an in vitro validation for the production of inhibitory substances // *Biom J.* – 2017. – Vol. 40. – P. 270–283.
- 24 Шигаева М.Х., Оспанова М.Ш. Микрофлора национальных кисломолочных напитков. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 150 с.
- 25 Ермолаева А.Н., Алгожина У.Ж., Тен О.А., Балпанов Д.С. Изучение культур молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кумыса различных регионов Северного Казахстана // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2012. – №3. – С. 87-90.
- 26 Баубекова А.С., Конуспаева Г.С., Ахметсадыкова Ш.Н., Ахметсадыков Н.Н. Подготовка промышленного производства заквасок– выделение и идентификация бактерий для кумыса и шубата // *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. №1/2 (60). – 2014. – С. 178-181.
- 27 Ringo E., Andersen R., Sperstad S., Zhou Zh., Ren P., Breines E.M., Hareide E., Yttergård G.J., Opsal K., Johansen H.M., Andreassen A.K., Kousha A., Godfroid J., Holzapfel W. Bacterial Community of koumiss from Mongolia investigated by culture and culture-independent methods // *Food Biotechnology*. – 2014. – Vol. 28. – P. 333–353.

- 28 Yao G., Yu J., Hou Q., Hui W., Liu W., Kwok L.-Y., Menghe B., Sun T., Zhang H., Zhang W. A Perspective Study of Koumiss Microbiome by Metagenomics Analysis Based on Single-Cell Amplification Technique // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – Art. 165.
- 29 Behera S.K., Panda S.K., Kayitesi E., Mulaba-Bafubandi A.F. Kefir and Koumiss. Origin, Health Benefits and Current Status of Knowledge // Ramesh C. Ray and Didier Montet (eds.) *Fermented Food—Part II: Technological Interventions*. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2017. – P. 400-417.
- 30 Oleinikova E.A., Aitzhanova A.A., Saubenova M.G., Amangeldy A.A., Kebekbaeva, Elubaeva M.E. Isolation and selection of lactic acid bacteria antagonistically active against opportunistic *Candida* yeast // *Микробиология және вирусология*. – 2018. – № 3(22). – С. 103-109.
- 31 Magnusson J., Schnurer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound // *Applied Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 1-5.
- 32 Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // *Известия Алтайского государственного университета*. – 2012. – № 3-1. – С. 41-44.
- 33 Черкасов С.В., Семенов А.В. Микробная регуляция антагонистической активности лактобактерий // *Сибирский медицинский журнал*. – 2012. – №2. – С. 78-82.
- 34 Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // *Известия АлтГУ*. – 2012. – №3-1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyy-analiz-metodov-opredeleniya-antagonisticheskoy-aktivnosti-molochnokislyh-bakteriy>
- 35 Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – С. 459.
- 36 Лысак, В. В. *Микробиология. Практикум: пособие* / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2015. – С. 34.

References

- 1 Shevjakov M.A. (2003) Diagnostika i lechenie kandidoza kishchechnika [Diagnosis and treatment of intestinal candidiasis]. *Terapevticheskij arhiv*, no 11, pp. 77-79.
- 2 Gouba N., Drancourt M. (2015) Digestive tract mycobiota: A source of infection. *Médecine et maladies infectieuses*, vol. 45, pp. 9–16.
- 3 Coogan M.M., Fidel P.L., Komesu M.C., Maeda L.P. (2006) *Candida* and mycotic infections. *Adv. Dent. Res.*, vol. 19, pp. 130-138.
- 4 Clark T. A., Hajjeh R. A. (2002) Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 15, pp. 569–574.
- 5 Segal E. (2005) *Candida*, still number one – what do we know and where are we going from there? *Mycoses*, vol. 48, Issue s1, pp. 3-11.
- 6 Jyoti B., Suresh A.K., Venkatesh K. (2003) Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World J Microbiol Biotechnol.*, vol. 19, pp. 509–515.
- 7 Lanciotti R., Patrignani F., Bagnolini F., Guerzoni M.E., Gardini F. (2003) Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.*, vol. 20, pp. 537–543.
- 8 Schnürer, J., Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives (2005) *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 16, pp. 70–78.
- 9 Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F. (2010) Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control.*, vol. 21, pp. 370–380.
- 10 Crowley S., Mahony, J., van Sinderen D. (2013) Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 33, pp. 93–109.
- 11 Le Lay C., Coton E., Le Blay G., Chobert J. M., Haertlé Th., Choiset Y., Van Long N. N., Meslet-Cladière L., Mounier J. (2016) Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology.*, vol. 239, pp. 79-85.
- 12 Pothuraju R., Sharma R.K. (2018) Interplay of gut microbiota, probiotics in obesity: a review. *Endocrine, metabolic and immune disorders-drug targets*, vol. 18, pp. 212–220.
- 13 Vijayaram S., Kannan S. Probiotics: the marvelous factor and health benefits (2018) *Biomed Biotechnol Res J.*, vol. 2, pp. 1–8.
- 14 Wagner R.D., Johnson S.J. (2012) Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci.*, vol. 19, pp. 58.
- 15 Ranadheera C.S., Evans C. A., Adams M. C., Baines S. K. (2014) Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *J Funct Foods.*, vol. 8, pp. 18–25.
- 16 Matsubara V. H., Wang Y., Bandara H. M., Mayer M. P., Samaranyake L. P. (2016) Probiotic *Lactobacilli* inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 100(14), pp. 6415-6426.
- 17 Tan Y., Leonhard M., Moser D., Ma S., Schneider-Stickler B. (2018) Inhibitory effect of probiotic *Lactobacilli* supernatants on single and mixed non-*albicans* *Candida* species biofilm. *Archives of Oral Biology.*, vol. 85., pp. 40-45.

- 18 Aartia Ch., Khusroa A., Vargheseb R., Arasuc M. V., Agastiana P., Al-Dhabic N. A., Ilavenild S., Choid K. Ch. (2018) In vitro investigation on probiotic, anti-Candida, and antibiofilm properties of *Lactobacillus pentosus* strain LAP1.. *Archives of Oral Biology*, vol. 89, – pp. 99-106.
- 19 Cross M. L. (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 34, Issue 4, pp. 245-253.
- 20 Kanmani P., Kumar R. S., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V., Arul V. (2013) Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 53, pp. 641e658.
- 21 Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G. (2012) Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int J Food Microbiol.*, vol. 155(3), pp.185-190.
- 22 Song Y. G., Lee S. H. (2017) Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Arch Oral Biol.*, vol. 76, pp. 1-6.
- 23 Prabhurajeshwar C., Chandrakanth R.K. (2017) Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: an in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biom J*, vol. 40, pp. 270–283.
- 24 Shigaeva M.H, Ospanova M.Sh. (1983) Микрофлора национал'ных кисломолочных напитков [Microflora of national fermented milk drinks]. Alma-Ata: Nauka. 150 s.
- 25 Ermolaeva A.N., Algozhina U.Zh., Ten O.A., Balpanov D.S. (2012) Изучение культур молочнокислых микроорганизмов, выделенных из кумыса различных регионов Северного Казахстана [Study of cultures of lactic acid microorganisms isolated from koumiss from various regions of Northern Kazakhstan]. *Biotechnologija. Teorija i praktika*, no 3, pp. 87-90.
- 26 Baubekova A.S., Konuspaeva G.S., Ahmetsadykova Sh.N., Ahmetsadykov N.N. (2014) Podgotovka promyshlennogo proizvodstva zakvasok– vydelenie i identifikacija bakterij dlja kumysa i shubata [Preparation of starter industrial production – isolation and identification of bacteria for koumiss and shubat]. *Vestnik KazNU. Serija biologicheskaja*, no 1/2 (60), pp. 178-181.
- 27 Ringo E., Andersen R., Sperstad S., Zhou Zh., Ren P., Breines E.M., Hareide E., Yttergård G.J., Opsal K., Johansen H.M., Andreassen A.K., Kousha A., Godfroid J., Holzapfel W. (2014) Community of koumiss from Mongolia investigated by culture and culture-independent methods. *Food Biotechnology*, vol. 28, pp. 333–353.
- 28 Yao G., Yu J., Hou Q., Hui W., Liu W., Kwok L.-Y., Menghe B., Sun T., Zhang H., Zhang W. (2017) A Perspective Study of Koumiss Microbiome by Metagenomics Analysis Based on Single-Cell Amplification Technique. *Frontiers in microbiology*, vol. 8, Art. 165.
- 29 Behera S.K., Panda S.K., Kayitesi E., Mulaba-Bafubiani A.F. (2017) Kefir and Koumiss. Origin, Health Benefits and Current Status of Knowledge. In: Ramesh C. Ray and Didier Montet (eds.) *Fermented Food—Part II: Technological Interventions*. Boca Raton, London, New York: CRC Press, pp. 400-417.
- 30 Oleinikova E.A., Aitzhanova A.A., Saubenova M.G., Amangeldy A.A., Kebekbaeva, Elubaeva M.E. (2018) Isolation and selection of lactic acid bacteria antagonistically active against opportunistic *Candida* yeast. *Mikrobiologija zhəne virusologija*, no. 3(22), pp. 103-109.
- 31 Magnusson J., Schnurer J. (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied Environ. Microbiol.*, vol. 67, pp. 1-5.
- 32 Irkitova A.N., Kagan Ja.R., Sokolova G.G. (2012) Sravnitel'nyj analiz metodov opredelenija antagonisticheskoy aktivnosti molochnokislyh bakterij [Comparative analysis of methods for determining the antagonistic activity of lactic acid bacteria]. *Izvestija Altajskogo gosudarstvennogo universiteta*, no 3-1, pp. 41-44.
- 33 Cherkasov S.V., Semenov A.V. (2012) Mikrobnaja reguljacija antagonisticheskoy aktivnosti laktobakterij [Microbial regulation of the antagonistic activity of lactobacilli]. *Sibirskij medicinskij zhurnal*, no 2, pp. 78-82.
- 34 Irkitova A.N., Kagan Ja.R., Sokolova G.G. (2012) Sravnitel'nyj analiz metodov opredelenija antagonisticheskoy aktivnosti molochnokislyh bakterij [Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий]. *Izvestija AltGU*, no 3-1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyu-analiz-metodov-opredeleniya-antagonisticheskoy-aktivnosti-molochnokislyh-bakteriy>
- 35 Glanc S. (1998) *Mediko-biologicheskaja statistika [Медико-биологическая статистика]*. М., *Praktika*, pp. 459.
- 36 Lysak, V. V. (2015) *Микробиологija. Praktikum: posobie [Микробиология. Практикум: пособие]* / V. V. Lysak, R.A. Zheldakova, O. V. Fomina. – Minsk : BGU, P. 34.