

1. Новиков А.В. Экология, окружающая среда и человек // М.: Наука. – 2001. – 306 с.
2. Fahring R.F., Lang R., Madle S. General strategy for the assessment of genotoxicity // *Mutat. Res.* – 1991. – Vol. 252. – P. 161-163.
3. Тарасов В.А., Абилев С.К., Велибеков Р.М., Асланян М.М. Эффективность батарей тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений // *Генетика.* – 2003. - Т.39. - №10. – С.1406-1417.
4. Yamaguci T. Mutagenic activity of various kinds of cheese on the Ames, rec and umu assay // *Mutat. Res.*-1989. Vol. – 224. - №4. -P.493-502.
5. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // *Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнообразия».* - Бишкек, 2007 - С. 278-280.
6. Diehl M., Fort F. Spiral Salmonella assay: validation against the standard pour-plate assay // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1996. – Vol. 27. – P. 227-236.
7. Guadano A., Pena E., Azucena G.C., Jose F.A. Development of new bioluminescent mutagenicity assay based on the Ames test // *Mutagenesis*, 1999, Vol.14, № 4. -P.411-415.
8. Quillardet P., Huisman O., De An R., Hofnung M. SOS-chromotesti, ei direct assay of induction of a SOS function in *Escherichia coli* k12 to measure genotoxicity // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* - 1982. - Vol.79. - P.5971-5975.
9. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // *Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнообразия».* - Бишкек, 2007 - С. 278-280.

Приводится краткая характеристика основных разновидностей бактериальных тест-систем на мутагенез и репарацию, применяемых в экотоксикологии. Обсуждаются их достоинства и недостатки. Разработана новая модификация Rec-хромотеста. Она рекомендуется для использования в генетической токсикологии при скрининговых исследованиях для определения ДНК-тропной и антигенотоксической активности различных факторов.

The short characteristic of the basic versions of bacterial test systems on mutation and a reparation, applied in ecotoxicology is resulted. Their merits and demerits are discussed. Is developed new updating Rec-hromotests. It is recommended for use in genetic toxicology at screenings researches for definition of DNA-trops and antigen toxics to activity of various factors.

И.С. Савицкая, А.С. Кистаубаева, К. Низметова, Н.В. Воронова

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЛАКТОБАЦИЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КАРБЕНИЗИРОВАННОМ СОРБЕНТЕ (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

При пероральном приеме пробиотиков, содержащих живые микроорганизмы или их активные метаболиты, преодоление естественных барьеров (кислая среда и протеолитические ферменты желудка или секреты мембран кишечных и слизистых оболочек и ворсинок) сопровождается значительной потерей исходной активности готовых лекарственных форм. Клинико-экспериментальные исследования показали, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют более 90% своей активности еще до момента попадания в кишечник [1].

Для сохранения жизнеспособности клеток бактерий-пробиотиков их можно, но и закреплять на поверхности носителя-сорбента [2].

Среди сорбентов, которые могут быть использованы для иммобилизации пробиотиков особый интерес представляют активированные угли нового типа, полученные путем высокотемпературной карбонизации и последующей активации отходов растительного происхождения, таких как скорлупа грецких и кокосовых орехов, абрикосовые косточки, рисовая шелуха и т.п. Несомненным достоинством этих сорбентов является то, что производятся они из дешевого, причем ежегодно возобновляемого растительного сырья. Широкий диапазон размеров пор и большая удельная поглощающая поверхность карбонизованных материалов обеспечивают наличие у них высоких прикрепительных и детоксикационных свойств [3].

Это послужило основанием для изучения возможности иммобилизации клеток лактобацилл на сорбенте из зауглероженной рисовой шелухи (ЗРШ), полученной Институте проблем горения КазНУ им. аль-Фараби.

Цель работы: Исследовать влияние иммобилизации клеток лактобацилл на зауглероженной рисовой шелухе на их антагонистическую активность и устойчивость к неблагоприятным факторам.

Материалы и методы исследования

В качестве пробиотического компонента использованы отобранные ранее 3 штамма бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащие к трем наиболее типичным видам интестинальной лактофлоры: *L.fermentum* АК-2R, *L.acidophilus* АА-1R и *L.plantarum* АР-1R.

Иммобилизацию клеток лактобацилл проводили в течение 10 часов, затем носитель отмывали от слабо прикрепившихся клеток изотоническим раствором и использовали в дальнейших экспериментах. Эффективность сорбции бактерий рассчитывали по разнице концентраций клеток микроорганизмов в культуральной среде до и после сорбционного процесса [4]. Для определения степени устойчивости иммобилизованных клеток лактобацилл к биологическим жидкостям использовали желудочный сок (20-30%), который добавляли в среду, содержащую 10^9 КОЕ/мл бактериальных клеток. Клетки лактобацилл экспонировали с желудочным соком в течение 60 мин, после чего производили высеив на твердую среду МРС-1 для определения количества жизнеспособных клеток. Антагонистическую активность определяли после совместного культивирования комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл (КИКЛ) в жидкой питательной среде МРС-5 в течение 24 часов в отношении трех тест-культур *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

Результаты и обсуждение

В литературе встречаются разноречивые данные о времени установления сорбционного равновесия в системе клетка-носитель. Некоторые авторы считают, что сорбция клеток из концентрированной суспензии микроорганизмов обычно полностью проходит за 5-10 минут, дальнейшее продление времени контакта, как правило, не увеличивает количества сорбированных клеток. Однако, для некоторых микроорганизмов сорбционный процесс продолжался в течение более длительного взаимодействия клеточной суспензии с носителем [4]. В наших экспериментах количество сорбированных клеток после 10 часового контакта суспензии с носителем намного выше, чем после 1-2 часового, что может объясняться изменением свойств поверхности клеток в процессе длительной иммобилизации [5]. Однако, увеличение времени контакта суспензии микроорганизмов с носителем до 24 часов не приводило к возрастанию количества прикрепившихся клеток. На основании этого можно считать, что 10 часов - оптимальное время для иммобилизации клеток лактобацилл на ЗРШ в использованных условиях.

Для повышения эффективности иммобилизации иногда предлагается окислительная модификация сорбентов гипохлоритом натрия, озоном [6] или поверхность сорбционных материалов обрабатывают двухвалентными катионами или этанолом [7]. Такой способ может менять заряд на поверхности дисперсионных частиц и часто приводит к усилению взаимодействия с противоположно заряженными группами на поверхности клетки. В связи с этим, с целью увеличения удельной емкости сорбент ЗРШ предварительно обрабатывали этанолом. Для этого использовали сетчатый стакан (стакан Бернрейтера), замачивали 100 г сорбента в 500 мл 80% этанола, смесь перемешивали и оставляли на 3 часа, затем сорбенты извлекали из цилиндра, после чего промывали дистиллированной водой и автоклавились при 1 атм. в течение 1 часа. Данные, иллюстрирующие способность клеток лактобацилл к иммобилизации на сорбенте ЗРШ, обработанным вышеуказанным способом, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность иммобилизации клеток лактобацилл на ЗРШ

Штаммы	Эффективность сорбции, %		Десорбция клеток, %	
	ЗРШ	ЗРШ после обработки этанолом	ЗРШ	ЗРШ после обработки этанолом
<i>L.acidophilus AA-1</i>	44±0,2	65±8,0	10±0,4	2±0,1
<i>L.plantarum AP-1</i>	40±0,07	62±4,0	12±0,06	4±0,2
<i>L.fermentum AK-2R</i>	54±0,3	78±6,0	8±0,5	3±0,05

Установлено, что после обработки сорбента этанолом его клеточная загрузка увеличилась и достигает – 62-78%. Кроме того, при модифицировании поверхностей этанолом десорбция клеток также снижается, что свидетельствует о повышении прочности их прикрепления к носителю.

На поверхности носителя – ЗРШ была иммобилизована и смешанная культура лактобацилл, состоящая из всех трех штаммов. Оказалось, что бактерии хорошо адсорбируются на данном сорбенте, титр прикрепившихся клеток достигает 10^9 КОЕ/г. Однако, количество клеток штаммов *Lactobacillus fermentum* АК-2R было гораздо больше, чем *Lactobacillus acidophilus* АА-1 и *Lactobacillus plantarum* АР-1. Полученный биосорбент содержит $5,3 \times 10^8$ КОЕ/г клеток штамма АК-2R. Клетки двух остальных штаммов распределены поровну ($2,5 \times 10^8$ КОЕ/г клеток штамма АА-1 и $2,2 \times 10^8$ КОЕ/г – АР-1). Следовательно, соотношение компонентов каждого вида составляет 2:1:1. Это может быть связано со

штаммовыми различиями поверхностных сайтов бактериальных клеток. Клетки на поверхности ЗРШ расположены в основном в виде микроколоний. Этот факт может иметь существенное значение, поскольку межбактериальное агрегирование, происходящее в микроколониях - начальный этап образования биопленок, в которых бактерии значительно лучше защищены от неблагоприятных воздействий [8-10].

В наших экспериментах таковым является кислая среда желудка, при транзите через который большая часть микробных клеток погибает. Для изучения чувствительности свободных и иммобилизованных клеток к такому стрессовому воздействию использовался желудочный сок, который был получен при гастроскопии. Его добавляли к культуре лактобактерий в среде МРС-1, содержащей 10^9 клеток/мл и инкубировали в течение часа, после чего определяли количество выживших клеток. При воздействии желудочного содержимого на жидкий концентрат лактобактерий их биотитр (концентрация живых клеток) уменьшается на 4 порядка (рис. 1). Это означает, что при пероральном применении суспензии лактобактерий следует ожидать, что лишь незначительная часть их жизнеспособных клеток достигает толстого кишечника. По этой причине его следует рассматривать скорее как ценный продукт питания, богатый ферментами, витаминами, но не как лекарственный препарат, предназначенный для активной колонизации кишечника лактобациллами. Использование в экспериментах с «модельным желудком» не свободных, а иммобилизованных клеток лактобацилл выявило, что прикрепление микробных клеток на сорбент ЗРШ оказывает защитное действие в отношении желудочного сока. Количество жизнеспособных клеток в этом случае снижается лишь на порядок. Скорее всего, это связано с тем, что клетки, входящие в состав образованных на сорбенте микроколоний, лучше защищены от бактерицидных факторов и неблагоприятного действия окружающей среды, поскольку покрыты дополнительной общей мембраной [1]. Поэтому иммобилизованные пробиотики по устойчивости к воздействию желудочного сока значительно превосходят жидкий концентрат на основе свободных клеток микроорганизмов и могут беспрепятственно преодолевать «желудочный» барьер при их пероральном введении.

Кроме того, их метаболическая активность выше, поскольку в составе микроколоний и биопленок она контролируется на основе «Quorum sensing». Эта система носит такое название, поскольку она координирует работу генов, экспрессия которых происходит только при достижении определенной плотности микробной популяции (не менее 10^7 клеток/мл). Гены, кодирующие ферменты, обеспечивающие синтез лактобациллами таких антимикробных факторов как бактериоцины и микроцины, регулируются этой системой [1; 11].

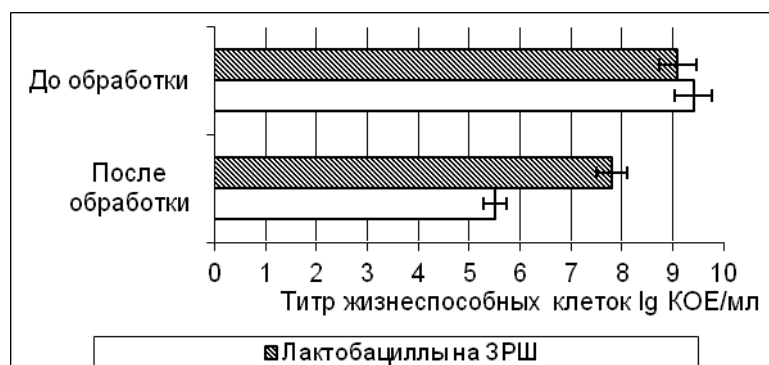


Рисунок 1 - Влияние искусственной желудочной среды на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл

Активность пробиотиков, определяемую в условиях *in vitro*, принято оценивать по титру микробных клеток в препарате или уровне их физиологической активности. Поскольку важнейшей характеристикой эффективности пробиотического действия является антимикробная активность, представлялось целесообразным изучение влияния иммобилизации на этот показатель. Антагонистическую активность определяли после совместного культивирования комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл (КИКЛ) в жидкой питательной среде МРС-5 в течение 24 часов в отношении трех тест-культур *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Ингибирующий эффект препарата определяли по количеству выживших клеток тест-штаммов (% к их уровню при выращивании в питательной среде без пробиотиков). Для этого в систему вносили 1 мл взвеси лактобацилл в концентрации 10^8 КОЕ/мл, 1 г КИКЛ или 1 г сорбента без клеток. Их добавляли к

10 мл суспензии тест-штаммов (10^8 клеток/ мл) в среде МРС-5, то есть соотношение культур составляло 0,1:1,0 (табл.2).

Таблица 2 – Антагонистическая активность комбинированного препарата при совместном культивировании с тест-организмами

Вариант	Количество жизнеспособных клеток тест-штаммов, % к контролю		
	<i>Salmonella typhimurium 50-90</i>	<i>Staphylococcus aureus S60</i>	<i>Candida albicans KAA88</i>
КИКЛ	0,8±0,01	0,6±0,03	8,3±0,2
КСК	17,5±2,1	16,5±1,3	29,6±1,6
ЗРШ	67±2,6	70±4,6	72±5,3
Контроль	100	100	100

Примечание: КИКЛ - комплекс иммобилизованных клеток лактобацилл; КСК-комплекс свободных клеток; ЗРШ – зауглероженная рисовая шелуха.

Видно, что комплекс из свободных клеток лактобацилл оказывает выраженное негативное действие на все 3 тест-культуры. В то же время и сам сорбент способен связывать до 28-33% клеток этих микроорганизмов. Поэтому при использовании комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл происходит эффективное подавление роста тест-культур. Согласно стандартным требованиям, количество живых клеток тест-штаммов бактерий по истечении 24 часового совместного культивирования с лактобактериями не должно превышать уровень 2 % по сравнению с контролем. При определении антагонистической активности КИКЛ после его совместного культивирования с микроорганизмами – мишенями эта цифра многократно превышена, то есть, иммобилизованные клетки пробиотиков в условиях *in vitro* практически полностью подавляют рост и жизнеспособность данных тест-организмов.

Таким образом, при сравнительной оценке устойчивости свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл к желудочному соку были получены результаты, свидетельствующие о достаточно высокой устойчивости иммобилизованных бактериальных препаратов к бактерицидному действию биологических жидкостей, вероятно, это связано с протективным действием карбонизированного носителя. Кроме того, клетки, образующие микроколонии, лучше защищены от бактерицидных факторов и неблагоприятного действия окружающей среды, что может способствовать преодолению «желудочного» барьера при их пероральном введении. Иммобилизация клеток лактобацилл повышает их антагонистическую активность

1 Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко- лабораторный синдром: современное состояние проблемы. - М., Гэотар-Медиа. - 2007. – С. 304-305.

2 Решетников В.И. Разработка лекарственных форм препаратов с иммунобиологической и сорбционной активностью // Фармация. – 2002. - №5. – С. 40-44.

3 Емуранов М.М., Шилина Ю.А., Рябкин Ю.А., Зашквара О.В., Шабанова Т.А., Бийсенбаев М.А., Мансурова Р.М., Мансуров З.А. Физико-химическое исследование углеродных материалов на основе нетрадиционного растительного сырья // Материалы 4 международного симпозиума «Физика и химия углеродных материалов. Нанотехнология». – Алматы, 2006. – С. 168-171.

4 Курдиш И.К. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и его биотехнологическое значение // Микробиологический журнал. – 1999. - Т. 61, № 1. - С. 60-73.

5 Жубанова А.А., Шигаева М.Х. Иммобилизованные клетки микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. - 1997. - № 2. - С. 3-12.

6 Тихонова Л. С., Белоцерковский М. Ц. Повышение эффективности сорбции микроорганизмов на активированном угле при поляризации сорбента // Прикладная биохимия и микробиология - 1995. - Т. XXV, №2. - С. 184 - 187.

7 Дигель И.Э., Жубанова А.А. Прикрепительная иммобилизация клеток микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. - 1997. - №4. - С. 3-9.

8 Волков М.Ю. Эффективные формы пробиотиков, иммобилизованных на природных адсорбентах // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2007. - № 1. – С. 48-51.

9 Dunne W.M.Jr. Bacterial adhesion; seen any good biofilms lately? // Clin. Microbiol. Rev. -2002. – Vol. 15. – P. 155-156.

10 Bhinu V.S. Insight into biofilm-associated microbial life. – J. Mol. Microbiol. – 2005. - Vol. 3. – P. 197-214.

11 Kuchma S.L., O’Toole G.A., Surface-induced and biofilm induced changes in gene expression // Curr. Opin. Biotachnol. - 2000. – Vol. 11. – P. 429-433.

Жоғары температурада көміртектелінген күріш кебегін этанолмен өндегенде оның сорбциялық қасиеті 8% жоғарылайды. Иммобилизденген лактобацилла клеткаларының қарын және өт сөліне тұрақты антагонистік бейсенділігі жоғары.

Ethanol cultivation carbonized acid sorbent on the Rice Husk base prefer the sorption property in attitude *Lactobacillus* cells. Cells immobilization of *Lactobacillus* is elevate their stability to gastric juice, and stimulate antagonistic activity.

И.С. Савицкая, А.С. Кистубаева, М. Абдулжанова, Ж. Жумагалиева

ПРИНЦИПЫ ОТБОРА ШТАММОВ ДЛЯ НОВОГО ЛАКТОСОДЕРЖАЩЕГО ПРОБИОТИКА (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

В последние годы интенсивно развивается биотехнология пробиотиков – препаратов, используемых для коррекции и профилактики микробиологических нарушений в желудочно-кишечном тракте человека и животных [1]. Поскольку, в кишечнике человека доминируют бифидобактерии и лактобациллы, большинство пробиотиков создается на основе этих бактерий [2]. Эффективность пробиотических препаратов определяется совокупностью биологических свойств штаммов, входящих в состав препарата [3]. Производственные бактерии должны обладать набором характеристик, позволяющих им конкурировать с патогенными и условно патогенными микроорганизмами. К ним относятся: апатогенность, антагонистическая активность, способность к адгезии и колонизации слизистой кишечника, активность кислотообразования, определенный уровень резистентности к соляной кислоте и желчи [4].

Повышение эффективности и расширение спектра биологической активности лактосодержащих пробиотиков может быть достигнуто за счет разработки комплексных препаратов на основе специально подобранных бактериальных композиций, включающих совместимые и взаимодополняющие штаммы [5].

Цель работы: сконструировать бактериальную композицию с учетом совместимости входящих в нее штаммов.

Материалы и методы исследования

Для составления бактериальных композиций использовали 10 штаммов лактобацилл, выделенных из кишечника 20 детей и взрослых обоего пола, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Антагонистическую активность исследовали методом отсроченного антагонизма в отношении стандартного набора тест-культур [6], а также гомоантагонизма – при совместном культивировании штаммов лактобацилл на плотной питательной среде [7]. Адгезивную активность определяли по способности штаммов агглютинировать эритроциты барана, морских свинок, человека IV(AB) и I(0) [8]. Для определения лектиноподобных структур использовали реакцию агглютинации с конкавалином А [9].

Результаты и обсуждение

Ключевым критерием при первичном отборе пробиотических штаммов лактобацилл является уровень и спектр их антагонистической активности, который традиционно определяется методами штрихового посева, диффузионным, или отсроченного антагонизма. При этом не учитывается природа продуцируемых отбираемыми штаммами веществ, обладающим антагонистическим действием по отношению к организмам-мишеням. У различных видов молочнокислых бактерий описаны бактериоцины с высокой и микроцины – с низкой молекулярной массой, нарушающие проницаемость бактериальной мембраны, блокирующие белковый синтез, подавляющие репликацию ДНК, изменяющие мембранный потенциал клетки или нарушающие процессы деления клетки [10]. С нашей точки зрения, в качестве критерия отбора штаммов для включения в пробиотическую композицию, являющуюся микробиологической основой комплексных препаратов, следует проводить селекцию штаммов лактобацилл, синтезирующих микроцины с широким спектром антагонистической активности.

Для их определения можно использовать метод агаровых слоёв – разновидность метода отсроченного антагонизма. Применяя его различные модификации, достаточно просто дифференцировать продукцию бактериоцинов с высокой молекулярной массой и микроцинов с низкой молекулярной массой. В первом случае на поверхность плотной среды наносят бляшками лактобациллы, которые после культивирования убивают парами хлороформа, затем наслаивают тест-культуру. Появление вокруг бляшки зоны отсутствия роста – положительный результат. Для индикации микроцинов на поверхность плотной среды с нанесенными, высохшими и обработанными в парах хлороформа бляшками, накладывают стерильный целлофан, а сверху на него наслаивают полужидкий агар с тест-культурой. Вокруг колоний, продуцирующих микроцины, появляются зоны