

данном случае итоговая смертность на 12-е сутки после заражения для всех испытуемых культур не превышала 55%.

В опыте на личинках старших возрастов природной популяции сибирского крестоцветного клопа (*Euridema ornate* L.) была протестирована активность девяти изолятов. Анализ полученных результатов показал, что большинство испытуемых культур проявляют высокую вирулентность к данному виду насекомого. Уровень смертности к 13-м суткам после инокуляции в семи из девяти случаев (77,8%) составил 94,5 – 100% (рисунок 3). При этом были выявлены существенные различия в динамике гибели личинок. Так, если для изолятов ВР3-06, ВN1-06, ВCh-06 и ВР5-06 уровень смертности к 9-му дню достиг уже 90-93,3%, то для культур ВР4-06, ВСu9-06 и ВСu14-06 значения этого показателя не превышали 60 - 76%.

В ходе ряда последующих экспериментов оценивали вирулентность новых природных изолятов на гусеницах трех видов бабочек: мельничной огневки (*Ephestia kuehniella*), яблонной моли (*Yponomeuta malinellus* (Zeller)), и крапивницы (*Aglais urticae* L.)

В первом опыте оценивали биологическую активность 11 изолятов, выделенных из насекомых различных систематических групп на гусеницах старших возрастов мельничной огневки. Наблюдения показали, что испытуемые культуры также обладают высокой гетерогенностью по признаку вирулентности к данному виду вредителя. Так уровень смертности гусениц к 14-м суткам после инокуляции варьировал в зависимости от изолята в пределах от 25 до 85%. При этом ни один из испытуемых изолятов не вызвал гибель вредителя на уровне 100%. Относительно высокую вирулентность показали только три культуры (ВУ4-06, ВN1-06 и ВCh-06). Для этих изолятов итоговый уровень смертности составил 80-85%. Здесь особо следует подчеркнуть, что первые две культуры были выделены из чешуекрылых (яблонной моли и совки, соответственно). Это в определенной мере свидетельствует об специфичности изучаемых изолятов.

Два изолята оказались в данном случае авирулентными (ВСu1-06 и ВСо2-06). Для них итоговый уровень смертности гусениц не отличался существенно по сравнению с контролем и составил 25,0 и 37,5%, соответственно.

Таким образом, гусеницы мельничной огневки проявили относительно высокую устойчивость к грибу *V. bassiana*.

В ходе следующего опыта на личинках младших возрастов яблонной моли изучали биологическую активность 6 изолятов гриба. В данном случае все испытуемые культуры гриба проявили высокую вирулентность к указанному виду вредителя.

К 12-му дню после заражения смертность гусениц варьировала в пределах от 85 до 100%. Несмотря на столь высокие значения смертности хозяина во всех вариантах опыта нами были выявлены существенные различия в скорости гибели вредителя. Так, если при заражении штаммом ВСu14-06 на 8-е сутки после начала опыта все обработанные особи погибли, то для других культур к этому дню уровень смертности составлял 62,5 – 85%. К 10-м суткам указанные различия нивелировались.

При обработке гусениц младших возрастов бабочки – крапивницы были получены аналогичные результаты. Во всех вариантах опыта уровень смертности был существенно выше в сравнении с контролем. При этом из шести протестированных культур гриба пять (ВР5-06, ВСu14-06, ВСu17-06, ВС2-06 и ВNu4-06) проявили высокую биологическую активность. В этих вариантах к 14-у дню после инокуляции смертность хозяина вне зависимости от штамма составила 95 – 100%. Существенных различий между указанными штаммами по скорости гибели хозяина не было выявлено.

Таким образом, и гусеницы яблонной моли и крапивницы обладают высокой чувствительностью к возбудителям микоза. Здесь еще раз хотелось бы подчеркнуть, что из трех протестированных видов чешуекрылых наиболее устойчивым является мельничная огневка (рисунок 4).

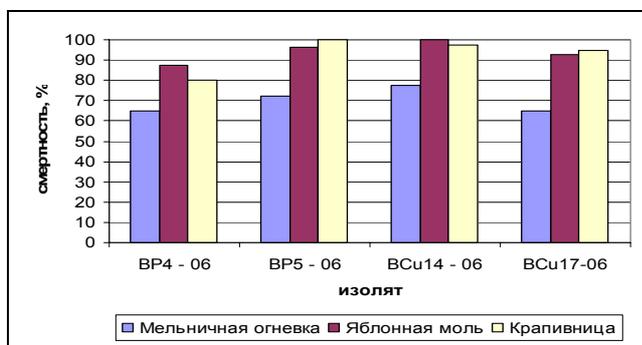


Рисунок 4 - Сравнительная чувствительность гусениц трех видов бабочек к природным изолятам гриба *V. bassiana*

Проведенный корреляционно-регрессионный анализ выявил тесную достоверную корреляционную зависимость между вирулентностью изучаемых культур гриба на перелетной саранче и ивовом листоеде ($r=0.78$, $p<0.00001$). Указанный факт свидетельствует о возможности отсутствия специфичности данных

изолятов по отношению к насекомым этих отрядов. Отличия по признаку вирулентности между группами штаммов, выделенных из насекомых разных отрядов, оказались не достоверными.

В результате проведенных исследований установлено, что штамм, обладающий высокой активностью по отношению к насекомым определенного отряда, со значительной долей вероятности оказывается более вирулентным к насекомым других отрядов. Трофической специализации у исследуемой группы изолятов не выявлено.

Полученные результаты согласуются с данными ряда других авторов. Так, [4] показано, что вирулентность изолятов *B. bassiana* по отношению к тепличной белокрылке *Trialeurodes vaporariorum* Wstw. не зависит от источников выделения – разные виды *Lepidoptera*, *Diptera*, *T. vaporariorum*. С.А Ренер и Е. Бакли [5] при исследовании генетического полиморфизма *B. bassiana* показали, что основную роль во внутривидовой дифференциации играет территориальный фактор, а хозяева патогена группируются по кластерам совершенно случайно. Однако использованный нами подход не дает оснований полностью отрицать существования специализации к тем или иным хозяевам внутри популяций энтомопатогенных гифомицетов.

Литература

- 1 Гештовт Н.Ю. Энтомопатогенные грибы. Биотехнологические аспекты. Алматы, 2002 - 288 с.
- 2 Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Систематика, биология, практическое значение. Л.: Наука, 1974 - 254 с.
- 3 Леднев Г.Р., Борисов Б.А., Митина Г.В. Возбудители микозов насекомых. (Пособие по диагностике). С.-Пб., 2003 - 79 с.
- 4 Огарков Б.Н., Огаркова Г.Р. Энтомопатогенные грибы Восточной Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутск. Ун-та, 2000 - 134 с.
- 5 Rehner S.A., Buckley E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs // *Mycologia*. 2005. V. 97. № 1. P. 84–98.

Тұжырым

Оңтүстік-шығыс Қазақстанда бөлініп алынған *Beauveria bassiana* саңырауқұлағының жаңа табиғи изоляттарының уыттылығы зерттелді. Әртүрлі жүйелі топтардағы бунақденелілердегі саңырауқұлақтың уыттылық белгілері бойынша жоғары ауытқуы көрсетілді. Әртүрлі бунақденелілерде саңырауқұлақтың уыттылықтары арасындағы тікелей және тығыз корреляциялық тәуелділік байқалды.

Summary

Investigate the new strains of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill isolated from different insects of South Kazakhstan region. It was found out that low-, medium- and high- virulent isolates. The isolates with high virulence to the insects of certain order were more active against the other insect orders. The close correlation ($R>0,78$) between isolates virulence against the beetle *Chrysomela saliceti* L and locusts *Locusta migratoria* L. was shown. With it was found out that strains isolated from one insect species in the same place can have rather different virulence.

УДК:579-035.571

Савицкая И.С.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЛАКТОБАЦИЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КАРБОНИЗОВАННОМ СОРБЕНТЕ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Сорбционная активность сорбента на основе карбонизованной рисовой шелухи в отношении клеток лактобацилл повышается после обработки этанолом. Имобилизация клеток лактобацилл повышает их устойчивость к желудочному соку и стимулирует антагонистическую активность.

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 пробиотика 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

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 высеv 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 их 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 объясняется 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 автоклавировали 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</i> АА-1	44±0,2	65±8,0	10±0,4	2±0,1
<i>L.plantarum</i> АР-1	40±0,07	62±4,0	12±0,06	4±0,2
<i>L.fermentum</i> АК-2R	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].

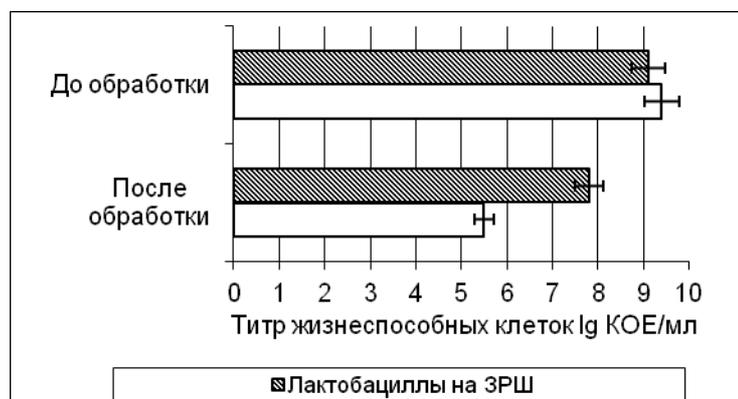


Рисунок 1 - Влияние искусственной желудочной среды на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл

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).

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