

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.

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

Вариант	Количество жизнеспособных клеток тест-штаммов, % к контролю		
	<i>Salmonella typhimurium</i> 50-90	<i>Staphylococcus aureus</i> S60	<i>Candida albicans</i> KAA88
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.

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 микроколонию, 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

Литература

- 1 Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинко- 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., Заиквара 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.

Тұжырым

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

Summary

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

**КОНСТРУИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ РАБОТКИ
ПОЛИКОМПОНЕНТНОГО СОРБИРОВАННОГО ПРОБИОТИКА**

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*Определена биологическая и технологическая совместимость штаммов лактобацилл. Составлена композиция из 3-х штаммов лактобацилл *Lactobacillus fermentum* АК-2R, *Lactobacillus acidophilus* АА-1, *Lactobacillus plantarum* АР-1. В композицию вошли штаммы, различающиеся по антагонистической активности, что расширяет спектр пробиотического действия консорциума.*

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

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 их 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 роста индикаторных штаммов [11].

Микроцинпродуцирующая активность выявлена у 10 штаммов (таблица 1).

В антимикробном действии исследуемых штаммов имеется определенная специфичность, спектры антагонистической активности у разных штаммов далеко не всегда перекрываются. Так, штаммы АА-1 R, АІ-

17, LK-7 и AC-31 R больше ингибируют грамположительные бактерии, но не дрожжи. Штаммы АК-2R, АК-9, АА-9 и АП-4R максимально эффективны против грамотрицательных энтеробактерий.

Таблица 1 – Спектр антагонистического действия лактобацилл – продуценов микроцинов

Штаммы	Зоны задержки роста тест-микробов, мм (M±m)		
	Антагонистическая активность в отношении грамположительных аэробных бактерий	Антагонистическая активность лактобацилл в отношении грамотрицательных энтеробактерий	Антагонистическая активность в отношении штаммов <i>Candida albicans</i>
АА-1R	22±0,70	12±0,36	3±0,11
АИ-17	12±0,14	18±0,38	5,5±0,21
АА-9	7±0,27	21±0,69	4,5±0,14
АР-1R	5,5±0,16	11±0,35	10,5±0,16
АП-4R	2±0,41	19±0,50	7,5±0,17
АС-31R	3,5±0,45	15±0,45	4,5±0,18
АС-1	17±0,34	8±0,35	2,5±0,09
АК-2R	13±0,35	22±0,56	7±0,55
АК-9	18±0,32	20±0,26	3±0,07
LK-7	19±0,18	6±0,27	3±0,19

Штаммы АР-1, АП-4R, АК-2R и АИ-17 оказывают негативное действие на дрожжевые грибки. Для того, чтобы совместить разные виды антагонистической активности, следовало составить композицию из нескольких штаммов.

Для первичного скрининга пробиотических бактерий, большое значение имеет способность к адгезии, ведь именно это качество определяет возможность их приживания в организме хозяина. Наиболее универсальной моделью для изучения адгезии микроорганизмов являются эритроциты, поскольку гликофорин их поверхностного слоя идентичен гликокаликсу эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для микробных адгезинов [8]. Экзогенные лактобациллы способны прикрепляться к эпителиоцитам, создавая барьер, препятствующий адгезии и транслокации во внутреннюю среду патогенной и условно-патогенной флоры. Эта адгезия осуществляется за счет наличия у лактобацилл лектиноподобных структур, плотно связанных с клеточной стенкой [9]. Некоторые штаммы способны синтезировать слизывающиеся с поверхности клеток адгезиноактивные белки, которые блокируют и дезинтегрируют патогены, защищая таким образом макроорганизм от способных к транслокации кишечных бактерий [12]. В связи с этим, полагаем, что наилучшую композицию препарата может дать комбинация штаммов-продуцентов микроцинов, в которой одновременно будут присутствовать наряду со штаммами, несущими на своей поверхности слизывающийся адгезиноактивный белок, еще и штаммы, адгезивную активность которых определяют лектиноподобные структуры, плотно связанные с клеточной стенкой.

Для определения последних у исследуемых штаммов использовали реакцию агглютинации с конкавалином А. Оказалось, что продукция белково-липотейхоевого комплекса присутствует у штамма АК-2R, принадлежащих к виду *L.fermentum*, а также у штаммов АР-1R и АП-4R вида *L.plantarum*. Выявлено также, что набор адгезинов у разных штаммов и видов лактобацилл, определяемый по способности культур агглютинировать эритроциты барана, морских свинок, человека IV(AB) и I(0) P+ вариабелен. Штамм LK-7 вида *L.casei* имел узкий спектр адгезинов – он умеренно агглютинировал только эритроциты барана. В то же время штаммы АА-1R и АИ-17, относящиеся к виду *L.acidophilus* активно агглютинировали все четыре вида эритроцитов.

Проведенные исследования позволяют заключить, что в состав комплексного пробиотического препарата можно включать культуры с выраженной экспрессией разных типов адгезинов, но не секретирующие лектинзависимый белок, и другой вариант лактобацилл, секретирующий во внешнюю среду этот субстрат, но при этом проявляющий умеренную адгезивность в тесте с эритроцитами. Исходя из полученных данных, для дальнейшего отбора оставлено 5 штаммов.

Совмещение штаммов и композицию и их совместное культивирование может приводить к проявлению антагонизма не только по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям (гетероантагонизм или прямой антагонизм), но и к представителям других видов рода *Lactobacillus*, а иногда даже к отдельным штаммам в пределах одного вида. Такой вид активности в литературе принято называть гомоантагонизмом или изоантагонизмом [7]. Поэтому при конструировании комплексных пробиотических препаратов, следует учитывать биосовместимости штаммов, входящих в бактериальный консорциум.

Оценку биосовместимости штаммов лактобацилл проводили путем одновременного совместного культивирования на плотной питательной среде, а также с использованием одного из вариантов метода отсроченного антагонизма. Результаты этих тестов суммированы в таблице 2.

По результатам экспресс-теста на биосовместимость выяснилось, что штамм *L.acidophilus* AI-17 несовместим со штаммами *L.fermentum* АК-2R, *L. plantarum* AP-1R и даже со штаммом того же вида *L. acidophilus* AA-1R. Судя по полученным в этом тесте результатам, AI-17 проявляет гомоантагонистическое действие в отношении всех используемых в эксперименте штаммов, кроме штамма LK-7.

Таблица 2 – Биосовместимость штаммов лактобацилл при совместном культивировании на плотной питательной среде

Штаммы	AA-1R	AI-17	AP-1R	AK-2R	LK-7
AA-1R	+	–	+	+	+
AI-17	–	+	–	–	+
AP-1R	+	–	+	+	+
AK-2R	+	–	+	+	+
LK-7	+	+	+	+	+

Поэтому для основы бактериальной композиции из двух представителей вида *L. acidophilus* был оставлен только штамм AA-1R. Из полученных в этом эксперименте данных видно, что все использованные в работе штаммы полностью совместимы друг с другом. Зона задержки роста или полностью отсутствует, или ее размер не превышает 2-3 мм. Исходя из этого, теоретически возможно составление 4^х разновидностей бактериальных композиций:

№1 - AA-1R+ AP-1R+LK7+AK-2R;

№2 - AA-1R + AP-1R+AK-2R;

№3 - AA-12+ AP-1R+ LK7;

№4 - AA-12+ АК-2R+ LK7.

В микробиоценозе кишечника человека присутствуют представители трех таксономических групп лактобацилл: термобактерии или облигатные гомоферментативные лактобациллы (ОГОЛ), к которым относится вид *L. acidophilus*; стрептобактерии или факультативные гетероферментативные лактобациллы (ФГЕЛ), в эту группу входит вид *L. plantarum* и бетабактерии - облигатные гетероферментативные лактобациллы (ОГЕЛ). Лактобациллы *L. fermentum* и *L.casei* - среди составляющих эту группу видов. Комплексный препарат должен включать представителей всех физиологических групп. Примером является Казахстанский пробиотик «Плантафермин». Такой микробиологический подход позволяет повысить эффективность пробиотикотерапии при дисбактериозах. Среди отобранных штаммов к группе ОГОЛ относится *L.acidophilus* AA-1R, Этот вид, как указывалось выше, составляет основу многих фармабиотиков. К группе ФГЕЛ относится штамм *L.plantarum* AP-1R, этот вид входит в состав широко известного препарата «Лактобактерин». Виды лактобацилл, такие как *L.fermentum* и *L.casei*, входящие в группу ОГЕЛ, в составе пробиотических препаратов используются значительно реже, хотя по своим метаболическим особенностям они имеют сходный путь метаболизма с бифидобактериями. Последнее выглядит достаточно привлекательно с точки зрения возможности замены бифидобактерий в комплексных препаратах на виды, входящие в группу ОГЕЛ, что может упростить производственный процесс, поскольку лактобациллы можно выращивать на одной питательной среде. Вместе с тем, используемые в работе штаммы, принадлежащие к группе ОГЕЛ – LK-7 и АК-2R обладают схожими антагонистическими особенностями, поэтому представляется обоснованным включение в композицию лишь одного из этих двух штаммов.

Таким образом, для разработки препарата предлагаются два варианта бактериального консорциума: №2 - AA-1R+AP-1R+AK-2R и №3 – AA-1R+AP-1R+LK7. Из этих двух композиций одну наиболее перспективную, используя при этом такую технологическую характеристику, как накопление биомассы.

Уровень накопления биомассы является определяющим технологическим параметром, характеризующим культуру лактобактерий и влияющим на количество жизнеспособных клеток в дозе препарата. Для культивирования использовали казеиново-дрожжевую среду (КДС) традиционно применяемую в производстве лактосодержащих пробиотиков. Высокие ростовые качества казеиново-дрожжевой среды объясняются рациональным подбором питательных веществ.

Глубинное культивирование лактобактерий проводили при температуре (37±1)°С в условиях постоянного перемешивания, продолжительность культивирования составляла 10-12 ч. Доза вносимого инокулята составляла 10% от объема питательной среды. В процессе культивирования с помощью 10% раствора аммиака поддерживали рН среды на уровне 5,5-6,0. В качестве углеводной добавки использовали 40% раствор глюкозы.

Оптическую плотность бактериальных культур в процессе роста определяли с помощью фотоэлектроколориметра (кювета-1 мм, длина волны – 540 нм), пробу бактериальной взвеси перед измерением разводили 0,9 % раствором натрия хлорида в соотношении 1:1.

Оказалось, что накопление биомассы у штамма LK-7 значительно ниже, чем у остальных штаммов. В связи с этим для комплексного препарата была выбрана бактериальная композиция состоящая из штаммов AA-1R + AP-1R + АК-2R.

При исследовании характера взаимоотношений между отдельными видами лактобацилл, входящих в состав комбинации для нового пробиотика, было установлено существование симбиоза между ними, выражавшееся в усилении антагонистической активности. Антагонистические свойства штаммов, входящих в комбинированный препарат исследовали с применением прямого совместного культивирования на плотной питательной среде (таблица 3).

Таблица 3 - Антагонистическая активность пробиотической композиции

Штаммы	Зона задержки роста, мм					
	<i>Salmonella typhimurium</i> 59-60	<i>Escherichia coli</i> 157	<i>Shigella sonnei</i> 1776	<i>Proteus vulgaris</i> 177	<i>Staphylococcus aureus</i> S60	<i>Candida albicans</i> KAA-88
AA-1R	15±2,0	12±1,0	16±1,1	13±1,5	10±1,1	0
AP-1R	10±1,0	8±0,4	7±0,8	11±1,7	8±0,6	10±1,3
АК-2R	8±0,5	6±0,7	10±0,7	8±0,7	15±0,5	0
комплекс	17±2,2	15±0,9	16±1,2	15±0,9	18±1,6	12±1,8

Использование штаммов в композиции увеличивало их антагонистическую активность против микроорганизмов-мишеней, кроме того, эта активность проявлялась теперь и в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов. Комплекс способен подавлять также и грибки рода *Candida*. То есть объединение штаммов лактобацилл в консорциум позволяет расширить спектр биологической активности будущего препарата.

В естественных средах обитания микроорганизмы находятся в условиях смешанных микробных популяций, где они вступают различного рода взаимоотношения друг с другом. Появляются данные, свидетельствующие о возможных изменениях адгезии микроорганизмов в этих условиях. Так, под влиянием одних микроорганизмов цитадгезия других может снижаться. Такое явление объяснимо либо формированием микробного барьера на поверхности клеток макроорганизма, либо конкуренцией за рецепторы для адгезинов. Иногда, наоборот цитадгезия микроорганизмов может усиливаться. Поэтому при создании бактериальных препаратов необходимо проведение исследований по изучению адгезивных свойств исследуемой комбинации лактобацилл в условиях смешанных микробных популяций. В работе использовали культуры стафилококков, сальмонелл, кандид и бифидобактерий. Исследования проводили параллельно при двух различных соотношениях лактобацилл и тест-культур 0,1:1; 1:1. В качестве контроля использовали суспензии отдельных микроорганизмов в концентрациях, соответствовавших их концентрации в опытном образце. Результаты по изучению адгезивных свойств исследуемой культуры лактобацилл в условиях смешанных микробных популяций представлены на рисунке 1.

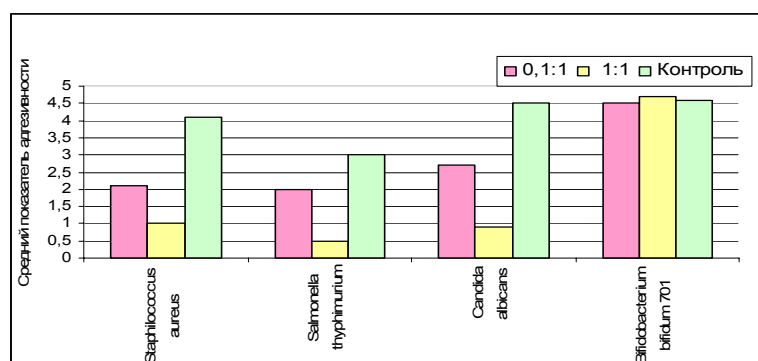


Рисунок 1 – Оценка адгезивных свойств тест-штаммов после культивирования с пробиотической композицией

В смешанных популяциях лактобациллы существенно снижали цитадгезию стафилококков при всех изученных соотношениях. Так, например средний показатель адгезии стафилококков в контроле был равен 4,1 в опытных вариантах при соотношении лактобацилл и стафилококков 0,1:1; 1:1 он был равен 2,1; 1,0 соответственно. Аналогичные результаты были получены в смешанных популяциях лактобацилл и кандид. При соотношении изучаемых лактобацилл с кандидами в соотношении 0,1:1; 1:1 средний показатель цитадгезии кандид снижался от 2,7 до 0,9. Контроль, при этом составлял 4,5 единицы. Отметим, что СПА сальмонелл был равен 3, а в условиях смешанных популяций при соотношении лактобацилл и сальмонеллами 0,1:1; 1:1 этот