**Принципы отбора штаммов ДЛЯ нового лактосодержащего ПРОБИОТИКА**

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

Казахский национальный университет им.аль-Фараби

В последние годы интенсивно развивается биотехнология пробиотиков – препаратов, используемых для коррекции и профилактики микроэкологических 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 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 роста индикаторных штаммов [11]. Микроцинпродуцирующая активность выявлена у 10 штаммов (таблица 1).

Таблица 1 – Спектр антагонистического действия лактобацилл – продуценов микроцинов

|  |  |
| --- | --- |
| Штаммы | Зоны задержки роста тест-микробов, мм (М±m) |
| Антагонистическая активность в отношении грамположительных аэробных бактерий  | Антагонистическая активность лактобацилл в отношении грамотрицательных энтеробактерий | Антагонистическая активность в отношении штаммов*Candida albicans* |
| АА-1R | 22±0,70 | 12±0,36 | 3±0,11 |
| АI-17 | 12±0,14 | 18±0,38 | 5,5±0,21 |
| АA-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 |
| АC-31R | 3,5±0,45 | 15±0,45 | 4,5±0,18 |
| АС-1 | 17±0,34 | 8±0,35 | 2,5±0,09 |
| AK-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 |

В антимикробном действии исследуемых штаммов имеется определенная специфичность, спектры антагонистической активности у разных штаммов далеко не всегда перекрываются. Так, штаммы АА-1 R, AI-17, LK-7 и AС-31 R больше ингибируют грамположительные бактерии, но не дрожжи. Штаммы AK-2R, АК-9, АА-9 и АП-4R максимально эффективны против грамотрицательных энтеробактерий. Штаммы АР-1, АП-4R, AK-2R и AI-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 приживления 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 слущивающиеся 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 слущивающийся 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 AK-2R, принадлежащих к виду *L.fermentum*, а также у шаммов 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+ вариабилен. Штамм LK-7 вида *L.casei* имел узкий спектр адгезинов – он умеренно агглютинировал только эритроциты барана. В то же время штаммы АА-1R и AI-17, относящиеся к виду *L.аcidophilus* 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 внешюю среду этот субстрат, но при этом проявляющий умеренную адгезивность в тесте с эритроцитами. Исходя из полученных данных, для дальнейшего отбора оставлено 5 штаммов.

Cовмещение 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 биосовместимость 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.

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

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Штаммы** | АА-1R | АI-17 | АР-1R | АК-2R | LK-7 |
| АА-1R |  | \_\_ | + | + | + |
| АI-17 | \_\_ |  | \_\_ | \_\_ | + |
| АР-1R | + | \_\_ |  | + | + |
| АК-2R | + | \_\_ | + |  | + |
| LK-7 | + | + | + | + |  |

По результатам экспресс-теста на биосовместимость выяснилось, что штамм *L.acidophilus* АI-17 несовместим со штаммами *L.fermentum* АК-2R, *L. plantarum* АР-1R и даже со штаммом того же вида  *L. acidophilus* АА-1R. Судя по полученным в этом тесте результатам, АI-17 проявляет гомоантагонистическое действие в отношении всех используемых в эксперименте штаммов, кроме штамма LK-7. Поэтому для основы бактериальной композиции из двух представителей вида *L. acidophilus* был оставлен только штамм АА-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 - АА-1R+ АР-1R+LK7+АК-2R;

№2 - АА-1R + АР-1R+АК-2R;

№3 - АА-12+ АР-1R+ LK7;

№4 - АА-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 микроэкологический подход позволяет повысить эффективность пробиотикотерапии при дисбактериозах. Среди отобранных штаммов к группе ОГОЛ относится *L.acidophilus* АА-1R, Этот вид, как указывалось выше, составляет основу многих фармабиотиков. К группе ФГЕЛ относится штамм *L.plantarum* АР-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 - АА-1R+АР-1R+АК-2R и №3 – АА-1R+АР-1R+LK7. Из этих двух композиций одну наиболее перспективную, используя при этом такую технологическию 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 AА-1R + AР-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 компоции

|  |  |
| --- | --- |
| Штаммы  | Зона задержки роста, мм |
| *Salmonella typhimurium* *59-60* | *Eschercihia coli 157* | *Shigella sonnei* *177б* | *Proteus vulgaris 177* | *Staphylococcus aureus*  *S60* | *Candida albicans**KAA-88* |
| АА-1R | 15±2,0 | 12±1,0 | 16±1,1 | 13±1,5 | 10±1,1 | 0 |
| АР-1R | 10±1,0 | 8±0,4 | 7±0,8 | 11±1,7 | 8±0,6 | 10±1,3 |
| AK-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 показатель у данной тест-культуры снижался и был равен соответственно 2; 0,5. Цитадгезия бифидобактерий в смешанных популяциях оставалась на уровне контроля во всех изученных вариантах.

Поскольку совместное применение трехкомпонентной пробиотической композиции снижает цитадгезию таких культур, как *S.typhimurium, S.aureus* и *C.albicans*, не изменяя при этом цитадгезии бифидобактерий, совместное использование штаммов в композиции позволяет существенно снижать адгезивные свойства патогенных и условно-патогенных бактерий.

Таким образом, полученная пробиотическая композиция обладает биосовместимостью, а объединение штаммов лактобацилл в композизию позволяет расширить спектр и уровень их антагонистической активности.

Литература

1 Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и ее функции. – Грантъ. - 1998. – Т.1. – 280 с.

2 Михайлова, Т.Л., Калинская Т.Ю., Румянцев В.Г. Биопрепараты и пищевые добавки в коррекции дисбактериоза // Рос. журн. гастроэнтерол, гепатол, колопроктол. – 1999. - Т.9, №3. - С. 67-70.

3 Ishibashi N., Yamazaki S. Probiotics and safety // Am. J. of Clin. Nutr. – 2001. – Vol. 73, № 2. – P. 465-470.

4 Dunne C., O`Mahony L., Murphy L. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings // American Journals of Clinic Nutrition. – 2001. – Vol. 73, № 2. – P. 386-392.

5 Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания. – 1999. - №2. – С. 32-40.

6 Ганина В.И., Лысенко А.М., Гурьева Ю.В., Калинина Н.Ф. Изучение антагонистической активности и идентификация бифидобактерий и молочнокислых палочек, рекомендуемых для получения продуктов лечебно-профилактического назначения и пробиотиков // Биотехнология. – 1999. – № 2. – С. 15-21.

7 Глушанова Н.А., Блинова А.И., Бахаева В.В. Об антагонизме пробиотических лактобацилл // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. - № 6. – С. 37-39.

8 Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. – 1986. - № 4. – С. 211-212.

9 Гизатулина С.С., Биргер М.О., Кулинич Л.И., Фиш Н.Г., Мазитова О.П., Бирюкова Н.В. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных бактерий и типу адгезинов // ЖМЭИ. – 1991. – № 4. – С. 21-23.

10 Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления // ЖМЭИ. – 2003. - № 3. – С. 109-113.

11 Parente E., Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – P. 628-638.

12 Коваленко Н.К., Подгорский В.С., Касумова С.А. Адгезия молочнокислых бактерий к эпителию различных полостей организма человека // Микробиол. журн. – 2004. – Т. 66, №4. – С. 62-68.

**Түйін**

Биологиялық және технологиялық лактобацилла штаммдарының сәйкестілігі анықталады. Үш штаммнан құралатын композиция *L.fermentum* AK-2R, *L.acidophilus* AA-1, *L.plantarum* AP-1 жасалынды. Композицияға үш штамм кірді, олар антагонисттік бейсенділігімен ерекшеленеді. Пробиотикалық консорциум қабілеттілігін кеңейтеді.

**Summary**

In the result of doing work has appointed determinant biological and technological compatibly of 3 lactobacillus strains. Was composed the composition of 3 lactobacillus strains: composition *L.fermentum* AK-2R, *L.acidophilus* AA-1, *L.plantarum* AP-1. Strains of which differentiated for antagonistic activity was extensions in composition. It extend spectrum of consortium probiotical effect.