

УДК 579.864.1:615.331

ПОИСК ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДОВ *LACTOBACILLUS* И *BIFIDOBACTERIUM* ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРОБИОТИКОВ.

Старовойтова С.А., Лазаренко Л.Н., Авдеева Л.В., Полищук Е.И., Тимошок Н.А., Шинкаренко Л.Н., Бабенко Л.П., Мокрозуб В.В., Спивак Н.Я., Чейпеш А.В., Николайчук В.И.

Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* перспективных для создания пробиотиков.- С.А. Старовойтова, Л.Н. Лазаренко, Л.В. Авдеева, Е.И. Полищук*, Н.А. Тимошок, Л.Н. Шинкаренко, Л.П.Бабенко, В.В.Мокрозуб, Н.Я. Спивак, А.В. Чейпеш, В.И. Николайчук*****.- Изучена антагонистическая активность пяти штаммов лакто- и бифидобактерий по отношению к музейным и клиническим штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Штаммы *Lactobacillus acidophilus* VK-3, *Lactobacillus bulgaricus* VK-5, *Bifidobacterium bifidum* VK-1 проявили наивысшую антагонистическую активность по отношению ко всем взятым в эксперимент референс-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее чувствительными к антагонистической активности лакто- и бифидобактерий оказались бактерии рода *Staphylococcus*. Показана биосовместимость изученных штаммов лакто- и бифидобактерий между собой.

Ключевые слова: лактобактерии, бифидобактерии, пробиотики, антагонизм, биосовместимость.

Адрес: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина; *Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Громашевского АМН Украины, ул. Н. Амосова, 5, Киев, 03038, Украина, ** Ужгородский национальный университет; Закарпатская обласная санепидемстанция, ул. Собранецкая, 96, Ужгород, 88000, Ужгородский национальный университет, биологический ф-т ул. Волошина, 32, 88000

E-mail: starovoitova_svetlana@svitonline.com

Screening of strains bacteria genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective for creation probiotics.-S.A. Starovoitova, L. N. Lazarenko, L.V. Avdeeva, E.I. Polischuk, N.A. Timoshok, L.N. Schynkarenko, N.Ya. Spivak, A.V. Cheypesh, V.I. Nikolaichyk.-Antagonistic activity of five strains of lacto- and bifidobacteria towards to museum and clinical strains of pathogenic microorganisms was studied. Strains *Lactobacillus acidophilus* VK-3, *Lactobacillus bulgaricus* VK-5, *Bifidobacterium bifidum* VK-1 showed the highest antagonistic activity towards to all reference-strains of pathogenic microorganisms, which were taken at the experiment. The most sensitive towards to antagonistic activity of lacto- and bifidobacteria were bacteria of genus *Staphylococcus*. The "biocompatibility" of studied strains of lacto- and bifidobacteria was shown.

Key words: lactic acid bacteria, bifidobacteria, probiotics, antagonism, "biocompatibility".

Address: Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Zabolotny Str., Kiev, 03143, Ukraine; Institute of Epidemiology and Infection illness AMN of Ukraine, 5, Amosova Str., Kiev, 03038, Ukraine, Uzhgorod National University, Voloshyn str., 32, Uzhgorod, 88000.

E-mail: starovoitova_svetlana@svitonline.com

На протяжении всей жизни на макроорганизм действует целый комплекс вредных факторов, негативно влияющих на нормальное функционирование основных систем его жизнедеятельности. Во-первых, влияние экологических условий, которые ухудшаются с каждым днем, увеличение количества стрессовых ситуаций; во-вторых, массовое бесконтрольное применение химиотерапевтических препаратов. Вследствии чего, постоянно возникают вопросы о способах конструирования и восстановления оптимальной микрофлоры организма хозяина. С этой целью в практику охраны здоровья все больше внедряются бактериальные препараты из представителей

облигатной и факультативной микрофлоры хозяина – пробиотики [1, 2].

Наиболее важным свойством пробиотических бактерий является обеспечение колонизационной резистентности – способности защищать стенки кишечника от проникновения во внутреннюю стенку организма, как бактерий, так и токсинов и токсических продуктов различного происхождения. В комплексе механизмов колонизационной резистентности важную роль играет антагонистическая активность пробиотических культур [2-6].

В связи с этим, целью нашего исследования было изучить антагонистическую активность

лакто- и бифидобактерий, перспективных для создания на их основе пробиотиков, по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования были штаммы лакто- и бифидобактерий, выделенные из ассоциативной культуры во время лабораторных исследований ферментированного биологического материала: *Bifidobacterium bifidum* VK-1, *Bifidobacterium longum* VK-2, *Lactobacillus acidophilus* VK-3, *Lactobacillus casei* VK-4, *Lactobacillus bulgaricus* VK-5.

Антагонистическую активность лакто- и бифидобактерий изучали с использованием референс-штаммов условно-патогенных микроорганизмов из музея культур Института микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины: *Staphylococcus aureus* B-918, *Staphylococcus aureus* B-917, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Staphylococcus aureus* 43, *Staphylococcus aureus* 8325, *Staphylococcus aureus* spp., штаммов, полученных из музея культур отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины: *Staphylococcus epidermidis* B-919, *Escherichia coli* B-906, *Enterococcus faecalis* B-915, *Klebsiella pneumonia* B-920, *Pseudomonas aeruginosa* B-900, *Candida albicans* Y-1918. А также по отношению к клиническим штаммам условно-патогенных микроорганизмов, полученных из музея культур лаборатории медицинской микробиологии с музеем патогенных для человека микроорганизмов ГП «Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Громашевского» АМН Украины: *Staphylococcus epidermidis* 38, *Staphylococcus epidermidis* 14, *Staphylococcus aureus* Q394, *Pseudomonas aeruginosa* Q351, *Escherichia coli* 5921, *Enterococcus faecalis* 347, *Klebsiella oxytoca*, *Candida albicans* 1763.

Антагонистическую активность лакто- и бифидобактерий определяли методом перпендикулярных штрихов [7]. Оценку биосовместимости лакто- и бифидобактерий проводили путем совместного культивирования бактерий по методу [8].

Результаты исследований и их обсуждение

Одним из важнейших критериев во время оценки перспективности штаммов для создания на их основе препарата-пробиотика является способность этих бактерий угнетать рост и размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Антагонистическая активность пробиотической флоры является одним из механизмов обеспечения колонизационной

резистентности макроорганизма. Антагонизм лакто- и бифидобактерий по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре хозяина реализуется: синтезом органических кислот, перекиси водорода, лизоцима, антибиотиков, бактериоцинов, конкуренцией за питательные вещества, высокой скоростью размножения популяций клеток, адгезией, и т.д. [9-11].

Ранее нами было экспериментально показано высокую антагонистическую активность бактерий рода *Lactobacillus*, а также композиционного препарата на их основе по отношению к грампозитивным и грамотрицательным патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [12-14].

В данной работе изучение антагонистической активности лакто- и бифидобактерий проводили в два этапа. На первом этапе изучали антагонизм молочнокислых бактерий по отношению к музейным штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, на втором – к клиническим штаммам.

Установлено, что исследуемые штаммы лакто- и бифидобактерий проявляли выраженные различия по способности подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (табл.1).

Результаты проведенных исследований показали, что все штаммы лакто- и бифидобактерий тормозили рост взятых в эксперимент тест-культур. Антагонистическая активность всех изученных штаммов была значительно выше по отношению к музейным штаммам тест-культур, чем к клиническим штаммам, выделенным от пациентов.

Наибольшей антагонистической активностью по отношению как к музейным, так и к клиническим штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов обладали *Lactobacillus acidophilus* VK-3, *Lactobacillus bulgaricus* VK-5 и *Bifidobacterium bifidum* VK-1.

Интересно отметить, что рост некоторых тест-культур практически полностью подавлялся определенными штаммами лакто- и бифидобактерий. Так, *Lactobacillus acidophilus* VK-3 подавлял рост культуры *Staphylococcus aureus* 8325 до 36 мм, а *Staphylococcus aureus* spp. до 35 мм, соответственно. Штамм *Lactobacillus bulgaricus* VK-5 практически полностью подавлял рост *Staphylococcus aureus* spp., *Escherichia coli* B-906, *Klebsiella pneumonia* B-920 (зоны задержки роста для них варьировали в пределах 43-46 мм). *Lactobacillus casei* VK-4 подавлял рост культуры *Staphylococcus aureus* spp., зона задержки роста при этом соответствовала 42 мм. Сравнительно высокие зоны задержки роста продемонстрировала культура *Bifidobacterium bifidum* VK-1 по отношению к *Staphylococcus aureus* 43 – 31 мм и *Staphylococcus aureus* spp. – 39 мм, соответственно.

Таблица 1. Антагонистическая активность исследуемых штаммов лакто- и бифидобактерий

Тест-культура	Штамм				
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> VK-3	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> VK-5	<i>Lactobacillus casei</i> VK-4	<i>Bifidobacterium bifidum</i> VK-1	<i>Bifidobacterium longum</i> VK-2
	Зона угнетения роста (среднее значение), мм				
Музейные штаммы					
<i>Staphylococcus aureus</i> B-918	22	14	11	29	13
<i>Staphylococcus aureus</i> B-917	14	12	13	18	22
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	21	11	16	17	15
<i>Staphylococcus aureus</i> 43	13	7	21	31	5
<i>Staphylococcus aureus</i> 8325	36	17	11	24	10
<i>Staphylococcus aureus</i> spp.	35	43	42	39	19
<i>Staphylococcus epidermidis</i> B-919	24	11	19	17	11
<i>Escherichia coli</i> B-906	18	46	7	7	27
<i>Enterococcus faecalis</i> B-915	23	23	6	6	5
<i>Klebsiella pneumonia</i> B-920	14	45	19	19	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-900	18	17	16	21	7
<i>Candida albicans</i> Y-1918	7	3	6	14	5
Клинические штаммы					
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 38	7	6	6	5	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14	16	18	12	9	8
<i>Staphylococcus aureus</i> Q394	6	4	8	3	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Q351	25	25	18	10	9
<i>Escherichia coli</i> 5921	7	29	12	20	11
<i>Enterococcus faecalis</i> 347	3	7	6	2	6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	5	8	4	6
<i>Candida albicans</i> 1763	4	12	10	12	7

Высокая антагонистическая активность также наблюдалась у:

- *Lactobacillus acidophilus* VK-3 по отношению ко всем представителям рода *Staphylococcus*, в том числе и к *Staphylococcus epidermidis* B-919 (зона задержки роста – 24 мм), *Staphylococcus epidermidis* 14 (16 мм), а также к: *Enterococcus faecalis* B-915 (23 мм), *Escherichia coli* B-906 (18 мм), *Pseudomonas aeruginosa* B-900 (18 мм), клиническому штамму *Pseudomonas aeruginosa* Q351 (25 мм), *Klebsiella pneumonia* B-920 (14 мм);

- *Lactobacillus bulgaricus* VK-5 аналогично по отношению ко всем штаммам рода *Staphylococcus*, кроме того: *Enterococcus faecalis* B-915 (23 мм), *Pseudomonas aeruginosa* B-900 (17 мм), также к большинству клиническим штаммам: *Staphylococcus epidermidis* 14 (18 мм), *Pseudomonas*

aeruginosa Q351 (25 мм), *Escherichia coli* 5921 (29 мм), а также по отношению к дрожжам *Candida albicans* 1763 (12 мм);

- *Lactobacillus casei* VK-4 по отношению бактерий рода *Staphylococcus*, а также *Klebsiella pneumonia* B-920 (19 мм), *Pseudomonas aeruginosa* B-900 (16 мм). Также штамм проявил высокие показатели антагонизма по отношению к клиническим штаммам: *Staphylococcus epidermidis* 14 (12 мм), *Pseudomonas aeruginosa* Q351 (18 мм), *Escherichia coli* 5921 (12 мм), а также дрожжей *Candida albicans* 1763 (10 мм);

- *Bifidobacterium bifidum* VK-1 ко всем представителям рода *Staphylococcus*, кроме того к: *Klebsiella pneumonia* B-920 (19 мм), *Pseudomonas aeruginosa* B-900 (21 мм), *Candida albicans* Y-1918 (14 мм), а также по отношению к клиническим

штаммам: *Escherichia coli* 5921 (20 мм) и дрожжам *Candida albicans* 1763 (12 мм).

- *Bifidobacterium longum* VK-2 оказался менее антагонистически активным по отношению ко всем взятым в эксперимент тест-культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Наибольшую антагонистическую активность штамм проявил по отношению к большинству представителей рода *Staphylococcus*, а также: *Escherichia coli* B-906 (27 мм). По отношению к клиническим штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов *Bifidobacterium longum* VK-2 проявил сравнительно не высокие значения антагонистической активности, хотя для всех клинических штаммов тест-культур наблюдались достаточные зоны угнетения роста в пределах 5-11 мм.

Как видно из полученных результатов, наиболее чувствительными к антагонистической активности всех исследованных штаммов лакто- и бифидобактерий оказались тест-культуры рода *Staphylococcus*. Для штамма *Lactobacillus acidophilus* VK-3 зоны задержки роста музейных тест-культур рода *Staphylococcus* варьировали в пределах от 13-35 мм, а для клинических – 6 - 16 мм; для *Lactobacillus bulgaricus* VK-5 - 7 - 43 мм и 4-18 мм, соответственно; для *Bifidobacterium bifidum* VK-1 – 17-39 мм и 3-9 мм, соответственно.

С развитием новейших технологий одним из популярных направлений – является направление создания комплексных пробиотиков, состоящих из нескольких различных штаммов и видов микроорганизмов. Это направление становится

перспективным, поскольку, дополняя друг друга, эти бактерии имеют более эффективное терапевтическое действие по сравнению с монопрепаратами. Исходя из этого, необходимо было оценить биосовместимость штаммов лакто- и бифидобактерий перспективных для создания комплексных пробиотиков.

Определение биосовместимости бактерий показало, что все пять штаммов молочнокислых бактерий взятых в эксперимент не являются антагонистами друг друга. Полученные данные открывают возможность компоновать изученные штаммы лакто- и бифидобактерий в разные комбинации и с разными их объемными соотношениями, тем самым получать пробиотики с различными свойствами для профилактики и терапии пациентов с различными дисбалансами микрофлоры.

Вывод: таким образом, исследование антагонистических свойств *in vitro* штаммов лакто- и бифидобактерий, перспективных для создания пробиотиков, продемонстрировали, что все исследованные штаммы обладают широким спектром антагонистической активности и являются активными антагонистами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также дрожжей рода *Candida*. Показано отсутствие антагонистической активности между изученными штаммами молочнокислых бактерий, что в перспективе дает возможность конструировать на их основе комплексные пробиотики.

1. Смирнов В.В., Коваленко Н.К., Подгорский В.С., Сорокулова И.Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов //Микробиол. журн.-2002.-Т.64, №4.-С.62-80.
2. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией //ЖМЭИ.-2004.-№1.-С.84-92.
3. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Аладышева Ж.И., Мацулевич Т.В. Пробиотики и механизмы их лечебного действия //Эксперим. и клин. гастроэнтерол.-2004.-№3.-С.83-87.
4. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов //БИОпрепараты.-2003.-№3.-С.2-5.
5. O'Sullivan D.J. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria //J.Agric.Food Chem.-2001.-Vol.49.-P.1751-1760.
6. Tannock G.W. Molecular assessment of intestinal microflora //Am.J.Clin.Nutr.-2001.-Vol.73 (suppl.).-P.410-414.
7. Постникова Е.А., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Кафарская Л.И. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов //Журн. микробиол.-2004.-№2.-С.64-69.
8. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* //Журн. микробиол.-2005.-№2.-С.56-61.
9. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления.-К.: Эксперт ЛТД, 2005.-362с.
10. Лукьянова Е.М., Янковский Д.С., Дымент Г.С. и др. Некоторые замечания относительно тактики использования пробиотиков в неонатологии и педиатрии //Современная педиатрия.-2005.-№3(8).-С.230-240.
11. Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции //ЖМЭИ.-1999.-№6.-С.102-105.
12. Старовойтова С.О. Розробка композицій поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*: Автореф. дис...канд. біол. наук: 03.00.20 /НАН України; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного.-К., 2008.-21с.
13. Старовойтова С.А., Орябинская Л.Б., Горчаков В.Ю., Дуган А.М. Биологическая активность молочнокислых бактерий // Науковий вісник Національного аграрного університету.-2008.-вип. 125.- С.227-233.
14. Starovoitova S., Oryabinskaya L. Development of the composition of the polystrain probiotic on basis of the bacteria of genus *Lactobacillus* // 21st International CODATA Conference Scientific Information for Society – from Today to the Future".-Kyiv, 2008.-С.170-171.

Отримано: 24 грудня 2008 р.

Прийнято до друку: 29 травня 2009 р