

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

С.А. Старовойтова, Л.Б. Орябинская, В.Ю. Горчаков, А.М. Дуган

Национальный технический университет Украины «КПИ»

Работа выполнена за средства гранта Президента Украины

*Четырнадцать штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* исследовано относительно их потенциальных пробиотических свойств (антагонизм, кислотообразование, образование перекиси водорода, синтез лизоцима, адгезия, устойчивость к действию антибиотиков и агрессивным условиям желудочно-кишечного тракта). Отобрано пять биосовместимых штаммов, с высокими показателями пробиотических свойств, которые войдут в состав нового полиштаммового пробиотика.*

Лактобактерии, пробиотик, пробиотические свойства, антагонизм, адгезия

Пробиотики, на основе лактобактерий и продуктов их жизнедеятельности, находят все более широкое применение при коррекции и профилактике различных дисбиозов. Создание полиштаммовых пробиотиков предполагает наличие биосовместимости между штаммами, антимикробной активности, адгезивности, устойчивости к действию антибиотиков и условиям желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1].

Цель работы – отбор биосовместимых штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, с высокой пробиотической активностью – основы полиштаммового пробиотика, для коррекции расстройств различных биотопов макроорганизма.

Материалы и методы. В работе использовали 14 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, из музея культур микроорганизмов кафедры промышленной биотехнологии, факультета биотехнологии и биотехники НТУУ «КПИ»: *L.murinus* LE IBM B-7037; *L.rhamnosus* LB3 IBM B-7038; *L.sp.LB4*; *L.acidophilus*+*L.rhamnosus* (Institute Rossell INC (IRINC), Canada); *L.acidophilus* EP317/402; *L.bulgaricus* LB51; *L.plantarum*; *L.acidophilus* (IRINC, Canada); *L.rhamnosus* (IRINC, Canada); *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB86 ВКПМ-B-5788; *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii* DSM20074; *L.murinus* DSM20452; *L.plantarum* (Лактобактерин), *L.rhamnosus* V[®]. Бактерии выращивали при 37°C на среде MRS.

Антагонизм определяли методом перпендикулярных штрихов на среде MRS с глюкозой и без нее [2]. Активность кислотообразования определяли титриметрически. Конечный результат выражали в градусах Тернера (Т°) [3]. Перекись водорода определяли титриметрически [4], продукцию лизоцима - методом агаровых пластинок [5], адгезию - развернутым (пробирочным) методом [6]. Резистентность бактерий к действию антибиотиков определяли методом диффузии в агар [7]. Устойчивость лактобактерий к агрессивным условиям ЖКТ определяли на среде MRS при pH 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 и 8,5, с различной концентрацией желчи (20%-40%), фенола (0,4%, 0,5%), хлорида натрия (2%-6%) [1], пищеварительных ферментов (трипсин (5мг/250мл), химотрипсин (5мг/250мл), комплекс ферментов: К1 - α -амилаза -2250 ед FIP, липаза -3000 ед FIP, протеаза -4500 ед FIP; К2 - α -амилаза -4500 ед FIP, липаза -6000 ед FIP,

протеаза –9000 ед FIP) и в желудочном соке. Культивировали при 37°C 270мин. Оценку биосовместимости проводили по методике [8].

Результаты подвергали статистическому анализу с использованием t-критерия Стьюдента, изменения считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследован антагонизм лактобактерий по отношению к 14 штаммам грампозитивных и грамотрицательных бактерий. Лактобактерии при культивировании на среде MRS с глюкозой проявляли высокий антагонизм ко всем тест-штаммам. Величина зон угнетения роста тест-культур варьировала для грампозитивных бактерий в пределах 7,4-41,2мм и для грамотрицательных - 8,3-42,3мм (рис.1). Предполагали, что антагонизм лактобактерий обусловлен накоплением молочной кислоты - конечного продукта катаболизма глюкозы. Вместе с тем четкой корреляции между угнетением роста тест-культур и образованием кислоты лактобактериями не установлено (рис.2).

Изучен антагонизм бактерий в условиях, исключающих кислотообразование (среда MRS без глюкозы). Даже в таких условиях обнаружено образование зон угнетения роста тест-штаммов, практически не отличающихся по размерам от таковых на среде MRS с глюкозой (рис.1). Лактобактерии продуцируют и другие вещества, обладающие антимикробными свойствами – перекись водорода, лизоцим, бактериоцины и др.

Как показало исследование образования перекиси водорода, лактобактерии не обладали способностью его синтеза.

Изучение лизоцимсинтезирующей активности лактобактерий дало возможность выявить корреляцию между синтезом фермента и их антагонизмом в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

Важнейшим свойством пробиотических штаммов является их способность адгезии к эпителию кишечника. Величины ИАМ лактобактерий как для нативных, так и для формализованных эритроцитов крови человека практически не отличались (табл.1). Одиннадцать штаммов по показателю ИАМ относились к высокоадгезивным (ИАМ = 4,0 - 6,57).

Бактерии, на основе которых разрабатываются пробиотики, должны характеризоваться устойчивостью к действию антибиотиков. В наибольшей степени угнетали рост лактобактерий антибиотики, нарушающие синтез белка – макролиды и тетрациклины (табл. 2). Остальные изученные группы антибиотиков не проявляли выраженного бактерицидного действия. Это дает возможность использовать пробиотики на основе лактобактерий, как препараты сопровождения при системной антибиотикотерапии.

Исследовано способность лактобактерий выживать в условиях ЖКТ. Бактерии были устойчивы к pH среды в диапазоне - 1,5-8,5, сохраняли жизнеспособность при всех концентрациях желчи, хлорида натрия, фенола, не разрушались желудочным соком и пищеварительными ферментами (рис.3). Предположительно лактобактерии, пройдя через верхние отделы ЖКТ, попадают в кишечник в активном состоянии.

Поскольку цель работы - разработка полиштаммового пробиотика, целесообразно было проверить тест-культуры на биосовместимость. Выявлено три типа взаимодействия: биосовместимость –48,9% случаев, угнетение роста

одного штамма другим -28,6%, угнетение роста обоих штаммов -22,5%. Отобрано пять штаммов-симбионтов с высоким уровнем пробиотических свойств: *L.rhamnosus* LB3, *L.delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L.rhamnosus*[®], *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86, *L.acidophilus* (C).

Выводы

Полученные данные позволяют рассматривать отобранные штаммы-симбионты, как основу нового эффективного пробиотика, для лечения нарушений нормальной микрофлоры хозяина.

Список литературы

1. Gotcheva V., Hristozova E., Hristozova T. et al Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains //Food Biotechnology.-2002.-**16**, №3.- P.211-225.
2. Постникова Е.А., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Кафарская Л.И. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2004.-№2.-С. 64-69.
3. Донских Е.Е., Гончарова Г.И. Качественный и количественный состав кислот, образуемых бифидобактериями //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-1988.-№7.-С. 11-15.
4. Виноградова Р.П., Кучеренко Н.Є., Литвиненко А.Р. та ін. Біологічна хімія. Практикум.- К.: Вища школа. 1977, 384с.
5. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Тоом М.А. О способности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-1975.-№8.-С.77-81.
6. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов //Лабораторное дело.-1986.-№4.-С.210-212.
7. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: МГУ. 1983. С.129-132.
8. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.-2005.-№2.- С.56-61.

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська, В.Ю. Горчаков, О.М. Дуган

Чотирнадцять штамів молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* досліджено відносно їх потенційних пробіотичних властивостей (антагонізм, кислотоутворення, утворення перекису водню, синтез лізоциму, адгезія, стійкість до дії антибіотиків та агресивних умов шлунково-кишкового тракту). Відібрано п'яті біосумісних між собою штамів, з високим рівнем пробіотичних властивостей, які увійдуть до складу поліштамового пробіотику.

Лактобактерії, пробіотик, пробіотичні властивості, антагонізм, адгезія.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA

S.O. Starovoitova, L.B. Oryabinskay, V.Yu. Gorchakov, A.M. Dugan

Fourteen strains of lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus* were assessed for potential probiotic properties (antagonism, production of organic acids, hydrogen peroxide, lysozyme-synthesizing activity, adhesion, resistance to antibiotics and aggressive conditions of gastro-intestinal tract). Five strains of non antagonistic bacteria with high indexes of probiotic properties were selected. These strains may be a composition of a polystrain probiotic.

Lactic acid bacteria, probiotic, probiotic properties, antagonism, adhesion.