



Биол. журн. Армении, 4 (61), 2009

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЯДА СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

К. ДЖ. КАРАПЕТЯН

ЗАО «НИИ Биотехнологии», МЭ РА,
gayanekarapetyan@rambler.ru

Исследованы штаммы молочнокислых бактерий (МКБ), выделенные из различных заквасок мацуна. Они имеют высокую антимикробную и протеолитическую активность, различаются по устойчивости к ферментам (пепсин, трипсин, проназа) и различным концентрациям желчи. Супернатанты, полученные после выращивания этих МКБ, подавляют рост антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli*, сохраняют антимикробную активность при pH 3,0-6,5 и подавляют рост патогенной микрофлоры. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные штаммы МКБ и их супернатанты обладают свойствами, соответствующими требованиям, предъявляемым к пробиотикам.

Молочнокислые бактерии – пробиотики - патогенная микрофлора - антибиотикоустойчивость

Հետազոտվել են մածուխի տարբեր մերաններից անջատված կաթնաթթվային բակտերիաների (ԿԹԲ) շտամներ: Հետազոտված շտամները ցուցաբերում են բարձր պրոտեոլիտիկ և հակամանրէային ակտիվություն և տարբերվում են միմյանցից ֆերմենտների (պեպսին, տրիպսին, պրոնազ), ինչպես նաև լեղու տարբեր կոնցենտրացիաների նկատմամբ կայունությամբ: ԿԹԲ-երի աճեցումից հետո ստացված վերնստվածքները ճնշում են հակաբիոտիկների հանդեպ կայուն *E. coli* շտամների և ախտածին միկրոֆլորայի աճն և պահպանում են իրենց հակամանրէային ակտիվությունը pH 3,0-6,5 տիրույթում: Անջատված ԿԹԲ-երը և նրանց վերնստվածքները օժտված են հատկություններով, որոնք համապատասխանում են պրոբիոտիկների նկատմամբ ներկայացվող պահանջներին:

Կաթնաթթվային բակտերիաներ-պրոբիոտիկներ-պաթոգեն միկրոֆլորա-կայունություն հակաբիոտիկների դեմ

The strains of different lactic acid bacteria (LAB), isolated from different ferments of matzoun, were studied. Investigated strains show high antibacterial and proteolytic activity, different in stability to enzymes (pepsine, tripsine, pronase) and to various concentrations of bile. Supernatants, obtained after growth of LAB, inhibited the growth of antibiotic resistant strains of *E. coli*, maintained their antibacterial activity at pH 3,0-6,5 and inhibited the growth of pathogenic microflora. Thus, the preliminary results testified, that strains and their supernatants possess the properties, appropriate to the requirements for probiotics.

Lactic acid bacteria - probiotics - pathogenic microflora - antibiotic resistance

Известно, что изменение микробиоценоза кишечника, вызванное болезнетворными микроорганизмами, сопровождается различными нарушениями жизненно важных функций организма, осложнением течения хронических заболеваний [2]. В настоящее время одним из перспективных направлений профилактики болезней человека и животных является применение пробиотиков, в состав которых входят микроорганизмы. Живые бактерии, входящие в состав пробиотиков, являются антагонистами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, и их применение нормализует микрофлору желудочно-кишечного тракта. В последние годы для профилактики желудочно-кишечных заболеваний, коррекции кишечного микробиоценоза после терапии антибиотиками и химическими препаратами, для повышения естественной резистентности организма применяют пробиотики, в частности, на основе молочнокислых бактерий (МКБ) [6]. Пробиотики представляют собой биологические препараты, состоящие из живых стабильных культур микроорганизмов или продуктов их метаболизма, которые обладают разносторонними фармакологическими свойствами. Положительный эффект при использовании пробиотиков обусловлен их участием в пищеварительном процессе и метаболизме организма-хозяина. Наиболее часто применяемые в пробиотических препаратах микроорганизмы - это различные штаммы лактобактерий и бифидобактерий [10]: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* *nodum* *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. Johnsonii*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. Rhamnosus*, *L. salivarius* и др, штаммы *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. adolescentis* и такие микроорганизмы, как *Escherichia coli* Nissle, *Saccharomyces boulardii*, *Sacch. cerevisiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis*.

Рядом авторов показано [6, 9], что пробиотики должны отвечать определённым требованиям и обладать заданными свойствами, в частности:

- быть симбионтными именно для человеческого организма, то есть должны быть изолированы из организма человека или тех видов животных, для которых они предназначены;
- сохранять необходимую концентрацию в процессе технологического производства. Полезное воздействие на организм хозяина должно быть подтверждено лабораторными исследованиями и клиническими наблюдениями;
- обладать колонизационным потенциалом, то есть сохраняться в пищеварительном тракте до достижения положительного действия (быть устойчивыми к низким значениям pH, желчным кислотам, антимикробным субстанциям, продуцируемым индигенной микрофлорой, хорошо адгезироваться к эпителию соответствующих слизистых оболочек);
- вырабатывать антибиотические вещества;
- положительно влиять на метаболические процессы в организме (влиять на витаминобразование, регулировать холестериновый обмен);
- модулировать иммунные реакции;
- обладать высокой скоростью роста в условиях, близких к таковым в кишечном тракте при культивировании *in vitro*;
- выделять анти *E.coli*-фактор, ингибирующий развитие колибактерий в кишечнике.

Устойчивость к желчи является одним из важнейших свойств микроорганизмов, вводимых в состав пробиотиков. Желчь поступает в дуоденальный отдел тонкого кишечника, что обуславливает отмирание большого количества бактерий, так как их клеточные мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к солям желчных кислот. В связи с этим эффективность пробиотических микроорганизмов зависит от их устойчивости к желчи [10].

Пробиотические микроорганизмы должны также быть устойчивыми к антибиотикам, которые наиболее часто применяются при разных расстройствах желудочно-кишечного тракта [9]. Одним из важных свойств бактерий, используемых в качестве пробиотиков, должна быть устойчивость к ряду ферментов пищеварительного тракта. Используемые пробиотики должны обладать антимикробной активностью, которая обусловлена продуктами метаболизма микроорганизма, такими как органические кислоты, диацетил, перекись водорода и др. [6, 8]. Пробиотики и пребиотики также должны проявлять антимикробную активность в широком диапазоне pH.

Исследованиями последних лет показано, что молочнокислые бактерии способны синтезировать биологически активные вещества – бактериоцины. По физико-химическим характеристикам бактериоцины являются белками или пептидами, которые различаются молекулярной массой и обладают широким спектром антибактериального действия [8].

Целью данной работы являлось исследование свойств новых штаммов молочнокислых бактерий, оценка их перспективности для использования в качестве основы пробиотических препаратов.

Материал и методика. Объектами исследования являлись штаммы молочнокислых бактерий, выделенные из национального продукта мацуна и рассольных сыров (полученных как из коровьего, так и овечьего молока) натуральных хозяйств различных регионов РА. Выделение чистых культур проводили на твердых средах MRS и гидролизованном молоке с содержанием 1,5 % агара. Музейные культуры поддерживали при -20° в обезжиренном молоке с добавлением 40 % глицерина. Для определения наличия антимикробной активности штаммы выращивали в течение 48 ч при температуре 37° в анаэробных условиях в питательном бульоне MRS и в жидкой питательной среде на основе подтвороженной сыворотки с добавлением органических солей и ростовых факторов в определенных концентрациях [3]. Видовая принадлежность штаммов, выделенных из мацуна и сыров, была определена методом секвенирования 16S PНК; штаммы представлены в основном бактериями вида *Lactobacillus plantarum* и *Pediococcus pentosaceus*. В работе также использовался штамм *Lactobacillus acidophilus* 1991 (ВКПМ-6257). Штаммы № 103 и 109 пока не идентифицированы.

Культуральные жидкости, полученные после выращивания исследуемых микроорганизмов, центрифугировали для отделения биомассы при 4000 об/мин в течение 30 мин. После отделения биомассы полученный супернатант выпаривали на ротационном испарителе при $35-38^{\circ}$, при остаточном давлении 0,01 мПа до СВ 20-53 %. Изменение pH супернатанта проводили с использованием 40 % -ного раствора NaOH.

Для определения антимикробных свойств супернатантов, полученных после выращивания МКБ, в качестве тест-культур использовали условно-патогенные бактерии *Salmonella typhimurium* Г-38, *E.coli* К-12, *B. subtilis* 17-89, содержащиеся в коллекции лаборатории микробиологических технологий НИИ Биотехнологии. Размеры зон подавления их роста проверяли нанесением 100 мкл пробы на поверхность агара с тест-культурой или методом лунок. Результаты оценивали по диаметру зоны ингибирования роста тест-культур в мм.

Для определения зависимости антимикробной активности супернатантов МКБ от pH активную кислотность супернатанта изменяли в диапазоне pH 3,0-8,0 добавлением 1 N соляной кислоты (HCl) или 40 % раствора NaOH с последующим выдерживанием при комнатной температуре в течение 4-х ч.

Для определения чувствительности супернатантов к различным ферментам исследуемые пробы инкубировали с добавлением определенного количества ферментов: протеиназы К, проназы Е в течение 60 мин при 37⁰, а пробы с трипсином, пепсином инкубировали при 25⁰.

Устойчивость супернатантов к желчи оценивали измерением диаметра зоны подавления роста тест-культуры после обработки супернатантов определенными концентрациями желчи в течение 90 мин при комнатной температуре. В работе использовали чистую желчь (ГОСТ 49-134-79).

Для определения чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам использовали стандартные диски антибиотиков с определенными концентрациями. Диски помещали на поверхность агара, предварительно засеянного соответствующими штаммами МКБ. Использовали следующие диски с антибиотиками, мг: амоксициллин-30 (АМС-30), эритромицин – 15 (Е-15), тетрациклин - 30 (ТЕ-30), левомицетин - 30 (LEV-30), пенициллин - 10 мг/а.е. (Р-10), стрептомицин - 10 (S-10), энрофлоксацин - 5 (ЕНО-5), ципрофлоксацин - 10 (СІР-10).

Для исследования способности супернатантов выделенных МКБ ингибировать рост антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli* нами были получены на основе *E. coli* K12 штаммы, устойчивые к действию определенных антибиотиков: стрептомицин (S_m), канамицин (K_m), ампициллин (A_p), хлорамфеникол (C_m), тетрациклин (T_c).

Все данные, приведенные в таблицах, статистически обработаны.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было исследовано более 120 различных штаммов молочнокислых бактерий, из коих отобрано 6 штаммов, обладающих высокой антимикробной активностью против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [5].

Устойчивость к антибиотикам, наиболее часто применяемым для лечения различных инфекционных заболеваний, исследована на примере некоторых отобранных штаммов МКБ. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1. Чувствительность изолированных МКБ к антибиотикам, Ø, мм

МКБ	Наименование антибиотиков							
	АМС-30	Е-15	ТЕ-30	Lev-30	Р-10	S-10	ЕНО-5	СІР-10
<i>L.acidophilus</i> 1991	30	30	30	45	30	12	0	0
<i>P.pentosus</i> 28	40	40	40	30	40	2	15	15
<i>L. plantarum</i> №64	30	25	25	15	15	0	0	2
<i>L. plantarum</i> № 65	30	28	22	28	22	0	0	2
<i>L. plantarum</i> № 66	30	30	20	25	12	0	0	0
№ 103	20	25	22	30	25	15	17	0
№ 109	20	15	0	20	0	8	15	0

Как видно из приведенных данных, штаммы МКБ имели различную чувствительность к антибиотикам. Все штаммы были относительно устойчивы к S-10, ЕНО-5, СІР-10 (диаметр подавления роста МКБ от 0 до 17 мм). Наименьшие размеры зон подавления роста антибиотиками наблюдали у штаммов №№ 109 и 103, что свидетельствует об их устойчивости к исследуемым антибиотикам.

Исследовали также способность подавления роста антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli* супернатантами МКБ. Результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты подавления роста антибиотикоустойчивых штаммов *E.coli* супернатантами изолированных МКБ, Ø, мм

Супернатанты МКБ	Антибиотикоустойчивые штаммы <i>E. coli</i> K- 12					
	контроль	S _{m+}	K _{m+}	A _{p+}	C _{m+}	T _{c+}
<i>L.acidophilus</i> 1991	20	24	24	18	18	22
<i>P.pentosus</i> 28	20	24	25	18	28	20
<i>L. plantarum</i> №64	20	20	18	20	20	18
<i>L. plantarum</i> №65	20	20	20	18	20	10
<i>L. plantarum</i> №66	21	20	18	20	18	18
№103	10	20	0	0	0	20
№109	20	20	22	20	24	0

Полученные экспериментальные данные показали, что исследуемые супернатанты МКБ обладали различной антибактериальной активностью по отношению к антибиотикоустойчивым штаммам *E. coli*. Размеры зон подавления роста составляли 18-28 мм. Можно допустить, что некоторые исследуемые МКБ в процессе роста выделяют в среду анти *E.coli* -фактор, который способен подавлять рост антибиотикоустойчивых штаммов. Следует отметить, что штамм №103 не подавлял рост K_{m+}, A_{p+}, C_{m+} штаммов *E.coli*.

Известно, что пробиотические микроорганизмы, а также продукты их метаболизма, проходя через разные отделы желудочно-кишечного тракта, подвергаются воздействию разных ферментов. Исследование чувствительности продуктов метаболизма МКБ, содержащихся в супернатанте и обладающих антибактериальной активностью к протеолитическим ферментам, показало, что супернатанты всех штаммов МКБ, кроме супернатанта штамма *L. acidophilus* 1991, практически полностью теряли антимикробную активность после обработки пепсином, но сохраняли ее при обработке трипсином, протеиназой К и проназой Е. Исследование устойчивости супернатантов МКБ к нагреванию при 120° в течение 15 мин показало сохранение их антибактериальной активности.

На проявление антибактериальной активности бактериоцинов, как и у других биологически активных веществ, оказывает влияние рН среды.

Результаты исследований антимикробной активности супернатантов МКБ в диапазоне рН от 3,0 до 8,0 приведены в табл. 3.

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, исследуемые штаммы проявляли высокую антимикробную активность при значениях рН 3,0-6,0. Проявление антимикробной активности на тест-культурах супернатантами МКБ №№ 65,103,109 наблюдалось также при рН 7,0- 8,0.

Согласно требованиям, которые предъявляются к микроорганизмам, входящим в состав пробиотиков, они должны быть устойчивыми к желчи [2]. Поэтому исследовано влияние разных концентраций желчи на проявление антимикробной активности препаратов (АМП), полученных очисткой супернатантов культуральной жидкости исследуемых МКБ методом ионообменной хроматографии [4]. Результаты экспериментов приведены в табл. 4.

Таблица 3. Размеры зон подавления роста супернатантами МКБ, Ø, мм

Супернатанты МКБ	Значение pH					
	3	4	5	6	7	8
<i>L.acidophilus</i> 1991	42	42	40	38	0	0
<i>P.pentosus</i> 28	26	22	46	34	0	0
<i>L. plantarum</i> № 64	24	20	28	24	0	0
<i>L. plantarum</i> № 65	18	16	20	24	11	9
<i>L. plantarum</i> №66	22	12	20	12	0	0
№103	22	16	16	16	10	10
№109	26	30	24	24	6	5

Таблица 4. Влияние разных концентраций желчи на подавление роста тест-культур под влиянием АМП, Ø, мм

АМП	pH	Желчь, %						
		0	0,1	0,2	0,5	1	2	5
<i>L.acidophilus</i> 1991	4,0	22	18	16	22	24	28	24
<i>P.pentosus</i> 28	4,5	18	20	26	20	22	26	26
<i>L.plantarum</i> №64	5,0	14	18	16	14	20	24	28
<i>L.plantarum</i> №65	5,0	14	16	18	16	20	22	22
<i>L.plantarum</i> №66	5,0	18	14	18	20	22	22	24
№103	5,0	20	24	28	28	22	20	20
№109	5,0	20	24	22	28	24	26	30

Как видно из полученных результатов, низкие концентрации желчи (0,1-0,2) существенно не изменяли антимикробную активность АМП, а высокие концентрации (>0,5), наоборот, стимулировали её. Отметим, что желчь в исследуемых концентрациях не проявляла антимикробной активности.

Спектр подавления роста патогенной микрофлоры, выделенной из больных органов животных некоторыми супернатантами исследуемых МКБ, приведен в табл.5.

Таблица 5. Влияние супернатантов на подавление роста патогенных бактерий, Ø, мм

Супернатанты МКБ	<i>S.thyphimurium</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>E.cloacae</i> sp.	<i>E.cloacae</i> sp.	<i>K.pneumoniae</i>
<i>L.acidophilus</i> 1991	32	24	36	36	38	44	0
<i>P.pentosus</i> 28	16	26	20	22	20	20	0
<i>L.plantarum</i> № 64	12	20	20	0	14	22	0
<i>L.plantarum</i> № 65	16	20	20	0	0	0	0
<i>L.plantarum</i> № 66	18	24	20	20	22	22	0

Как видно из приведенных данных, размеры диаметров зон подавления роста патогенных бактерий находились в пределах 12-44 мм. В наибольшей степени ингибирование роста наблюдалось при использовании

супернатанта штамма *L. acidophilus* 1991 (24-44 мм). Ни один из исследуемых супернатантов не проявлял ингибирующего действия на рост бактерий *K. pneumoniae*. Самое слабое воздействие наблюдалось при использовании супернатанта *L. plantarum* № 65.

Таким образом, полученные данные показывают, что супернатанты отобранных МКБ имеют различную чувствительность к антибиотикам, подавляют рост антибиотикоустойчивых штаммов *E. coli*, сохраняют антимикробную активность при pH 3,0-6,0, а некоторые при pH 8,0 проявляют различную устойчивость к ферментам, разным концентрациям желчи и подавляют рост патогенной микрофлоры. Эти результаты служат основанием для дальнейшего изучения выделенных нами новых штаммов МКБ в качестве основы пробиотических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егоров Н.С., Баранова. Антибиотики и химиотерапия, 6, с. 33-40, 1999.
2. Запруднов А.М., Мазанкова Л.Н. Микробная флора кишечника и пробиотики. Методическое пособие, М., 32с, 2001.
3. Карапетян К.Дж., Акопян А.С., Ф.Н.Тхруни., Балабекян Ц.Р. Ученые записки ЕГУ, Ереван, 3, с.123-130, 2008.
4. Патент РА 1723 А2 Агаджанян А.Е., Тхруни Ф.Н., Балабекян Ц.Р. и др. Способ получения антимикробного препарата из продуктов вторичного метаболизма штамма *L.acidophilus* 1991. 15.03.2006.
5. Тхруни Ф.Н., Попов Ю.Г., Карапетян К.Дж., Акопян А.С. РА. Сб. тезисов. Современное состояние биотехнологии в Армении и роль МНТЦ в ее развитии. Цахкадзор, 2008.
6. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. М., 3, с.288, 2001.
5. Greene J.D., Klaenhammer T.R. Appl. Envir. Microbiol. 60, p.4487-4494, 1994.
6. O'Sullivan D.J. J. Ag. Food Chem., 49, p.1751-1760. 2001.
7. Pradhan A., Majumbar U. K. Acta Pharmacol Toxico., 58, p-11-15. 1986.
8. Shaham K.M., Friend B.A., J. Appl Nutrient., 36, p 125-152, 1984.

Поступила 08.05.2009.