

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ

В статье показан способ повышения антагонистической активности бактерий, основанный на активации антагониста компонентами культуры, по отношению к которой добиваются повышения антагонизма. При использовании в качестве индикаторной культуры *S. aureus* наиболее выраженной способностью повышать антагонизм обладали фрагменты его клеточной стенки, которые можно использовать для усиления антагонистического действия пробиотиков и представителей индигенной флоры организма.

Введение

Одной из функций нормальной флоры организма является препятствие заселению и развитию аллохтонных микроорганизмов. Для восстановления этой функции используют препараты на основе живых бактерий и продуктов их жизнедеятельности [1]. Но большинство из них действует неспецифично, угнетая развитие и представителей автохтонной флоры [2], что может способствовать развитию инфекции. В связи с этим актуальным является создание препаратов и разработка способов, позволяющих стимулировать антагонистическую активность (АА) бактерий-симбионтов макроорганизма, в том числе входящих в состав пробиотиков. Учитывая, что синтез антибиотиков индуцибелен [7, 8], мы предположили, что способом повышения АА бактерий к конкретному патогену может явиться обработка штамма нормофлоры или пробиотика его клеточными компонентами, обладающими стимулирующими антагонизм свойствами. Выяснение этого предположения и определило цель работы.

Цель исследования: изучить влияние экзометаболитов и фрагментов клеточной стенки *Staphylococcus aureus* на антагонизм микроорганизмов и разработать способ повышения антагонистической активности бактерий.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы-антагонисты *Enterococcus faecalis* – 9 шт., *Lactobacillus casei* – 3 шт., выделенные из вагинального биотопа, *Escherichia coli* М-17 («Колибактерин»), *L. plantarum* («Лактобактерин»), *Bifidobacterium longum* («Бифидоформ») и *Bacillus subtilis* из коллекции Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

В качестве индикаторной культуры использовали *S. aureus*, выделенный из переднего отдела носа.

Идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам [5], с помощью тест-систем Api ID 32 Staph, rapid ID 32 Strep (Bio Merieux, Франция).

Культивирование лактобактерий проводили на МРС среде («HiMedia», Индия), остальных микроорганизмов – на МПБ (НПО «Питательные среды», Махачкала).

Для определения влияния *S. aureus* на АА бактерий использовали модифицированный метод [6], в котором тестировали культуральную жидкость исследуемых культур, обработанную компонентами *S. aureus*. В качестве последних использовали экзометаболиты и фрагменты клеточной стенки *S. aureus*. Для получения экзометаболитов суточную бульонную культуру индикаторного штамма центрифугировали при 3000 об./мин 15 минут, отбирали надосадочную жидкость и обрабатывали хлороформом (на 3 мл супернатанта – 0,1 мл). Клеточные стенки получали путем последовательной обработки биомассы *S. aureus* смесью этилового спирта и хлороформа, дистиллированной водой, 2М водным раствором гидроксида натрия, дистиллированной водой, буферным раствором трипсина (рН = 2), дистиллированной водой, этиловым спиртом, ацетоном.

Компоненты *S. aureus* – в опыте и МПБ – в контроле смешивали в соотношении 1:2 с исследуемой культурой антагониста, взвешенной в физиологическом, 0,9% водном растворе хлорида натрия, (ОД = 0,2, при $\alpha = 492$ нм, что соответствовало 10^9 кл/мл, в 96-

луночном планшете, объем пробы – 200 мкл), инкубировали смесь 1 час при 37° С, после чего ее разбавляли в 4 раза жидкой питательной средой пригодной, для роста исследуемой культуры, и вновь инкубировали сутки при 37° С, отделяли супернатант центрифугированием при 3000 об./мин 15 минут, обрабатывали его хлороформом из расчета 0,1 мл на 3 мл культуральной жидкости. Далее определяли антимикробную активность культуральной жидкости исследуемой культуры в опыте и контроле по ее способности подавлять выживаемость индикаторного штамма *S. aureus*. Для этого готовили на физиологическом растворе взвесь индикаторного штамма из суточной агаровой культуры (ОД = 0,15, при $\alpha = 492$ нм, что соответствовало 10^7 кл/мл, в 96-луночном планшете, объем пробы – 200 мкл). Затем смешивали 0,5 мл взвеси индикаторного штамма с 1 мл культуральной жидкости антагониста, выросшего в отсутствие и присутствии метаболитов индикаторной культуры. В контроле АА вместо метаболитов исследуемой культуры добавляли жидкую питательную среду, в которой культивировали антагонист (МРС – в случае лактобацилл и *B. longum*, МПБ – в остальных случаях). Смеси инкубировали 1 час при 37° С, добавляли в каждую по 6 мл МПБ и культивировали при 37° С. Производили высев *S. aureus* на плотную среду, используя метод серийных разведений, сразу и через 8 часов роста, подсчитывали КОЕ и вели расчет антагонистической активности по формулам:

$$AA_{\text{контроль}} = (A - B_1 / A) * 100\%$$

$$AA_{\text{опыт}} = (A - B_2 / A) * 100\%,$$

где А – степень прироста индикаторного штамма, КОЕ₀ / КОЕ₈;

B₁ – степень прироста индикаторного штамма, КОЕ₀/КОЕ₈, при действии метаболитов исследуемой культуры, обработанной МПБ (контроль АА);

B₂ – степень прироста индикаторного штамма, КОЕ₀ / КОЕ₈, при действии метаболитов исследуемой культуры, обработанной компонентами индикаторного штамма (опыт).

Об изменении АА исследуемой культуры судили по изменению выживаемости *S. aureus* при действии на него метаболитов исследуемой культуры, обработанной компо-

нентами *S. aureus*, по сравнению с действием метаболитов исследуемой культуры, обработанной МПБ.

Перекрестное антимикробное действие метаболитов исследуемой культуры, обработанной компонентами индикаторного штамма, изучали *E. faecalis* №42 по отношению к представителям нормальной флоры *L. acidophilus*, *S. epidermidis*, *C. minutissimum* (штаммы из коллекции ИКВС УрО РАН).

Влияние хлороформа на метаболиты исследуемой культуры, используемого в качестве стерилизующего материала, исключали путем сравнительного изучения антимикробной активности супернатантов исследуемой культуры, обеззараженных хлороформом и фильтрованием («Millipore», 0,22 мкм).

Определение рН проводили с помощью прибора «Мультистест» (г. Новосибирск).

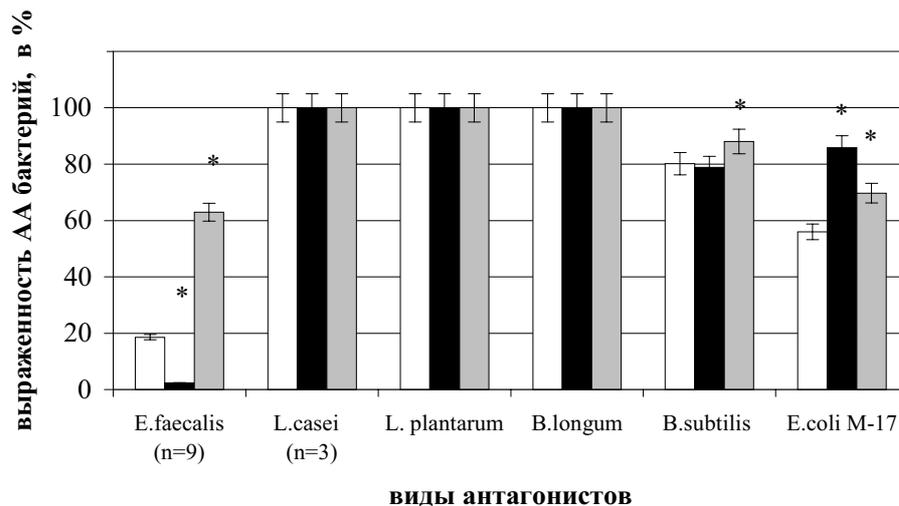
Результаты обрабатывали статистически, согласно рекомендациям [4].

Результаты и обсуждение

При изучении влияния компонентов *S. aureus* на АА исследуемых культур обнаружена их способность регулировать проявление антагонистической активности бактерий различных таксономических групп. Свойством регулировать антагонистическую активность изученных бактерий обладали метаболиты и клеточная стенка *S. aureus* (рисунки 1, 2).

Выраженное повышение активности наблюдали у *E. faecalis* и *B. subtilis* после добавления клеточной стенки *S. aureus* в среду их культивирования и у *E. coli* М-17, после обработки ее экзометаболитами стафилококка. Действие культуральной жидкости *S. aureus* на АА *E. faecalis*, напротив, носило ингибирующий характер – $2,42 \pm 4,82\%$ против $18,6 \pm 5,6\%$ в контроле ($p < 0,05$).

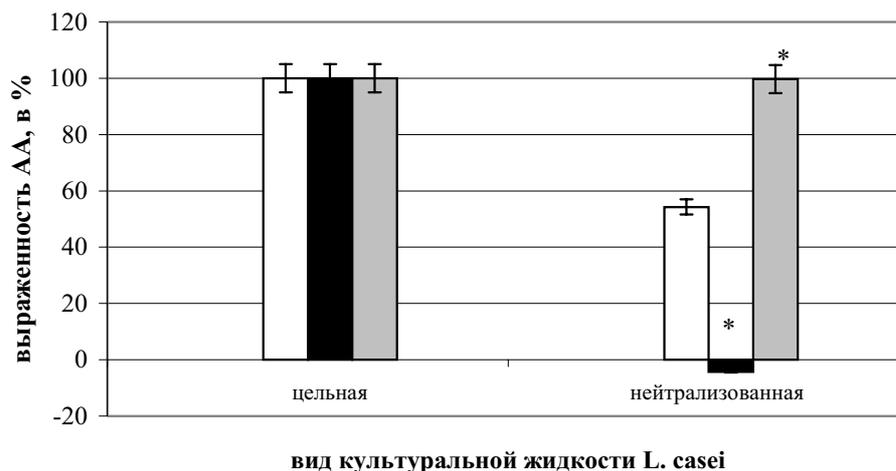
У лактобактерий и *B. longum* АА была на высоком уровне и не изменялась под действием компонентов *S. aureus*. Известно, что антимикробная активность лактобацилл складывается из действия различных веществ: бактериоцинов, лизоцима, перекиси водорода и кислот [1, 3], а низкое значение рН культуральной жидкости молочнокислых бактерий, внося существенный вклад в антагонизм этих микроорганизмов [9], может вуалировать дей-



* – $p < 0,05$ при сравнении значений антагонистической активности в опыте и контроле.

Цвет столбцов: белый – действие антагониста, выращенного с МПБ (контроль АА); черный – действие антагониста, выращенного с экзометаболизмом *S. aureus*; серый – действие антагониста, выращенного с клеточной стенкой *S. aureus*.

Рисунок 1. Выраженность антагонистической активности бактерий к *S. aureus*, обработанных его метаболитами и фрагментами клеточной стенки



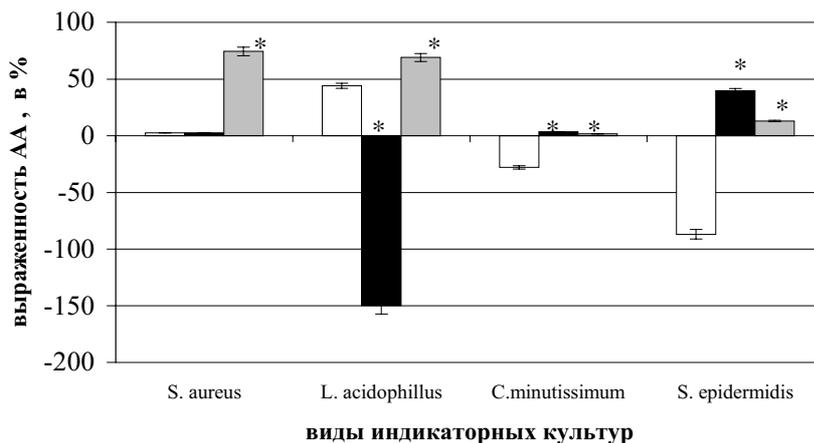
* – $p < 0,05$ при сравнении значений антагонистической активности в опыте и контроле.

Рисунок 2. Антимикробное действие цельной и нейтрализованной культуральной жидкости *L. casei* к *S. aureus*

ствии остальных антимикробных веществ. Мы изучили стимулирование АА в условиях, исключающих действие кислоты. опыты проводили на *L. casei*, культуральные жидкости которых нейтрализовали до $pH = 6,2$ (в среднем 100 мкл 1М раствора гидроксида натрия на 1 мл супернатанта), после чего определяли АА. Как показали результаты (рис. 2), низкие значения pH не позволили выявить эффект регуляции антагонизма, который имел место. Отмечено повышение АА при обработке *L.*

casei фрагментами клеточной стенки *S. aureus* и понижение, вплоть до появления стимулирующего рост эффекта – при действии экзометаболизмов. В связи с этим при изучении регуляции АА у молочнокислых бактерий, вероятно, следует учитывать «скрывающее» действие кислоты.

При использовании потенциальных препаратов на практике необходимо также учитывать перекрестное повышение АА в отношении представителей индигенной флоры.



* – $p < 0,05$ при сравнении значений антагонистической активности в опыте и контроле.

Рисунок 3. Перекрестное действие *E. faecalis* №42 на представителей нормофлоры, активированных компонентами *S. aureus*

На примере *E. faecalis* №42 показано, что при использовании для активации антагониста экзометаболических *S. aureus* наблюдали появление антагонизма только по отношению к *S. epidermidis*, а при обработки энтерококка фрагментами клеточной стенки *S. aureus* отмечено повышение АА ко всем тест-культурам, за исключением *C. minutissimum*, но наибольшее ее увеличение фиксировали по отношению к *S. aureus* (рис. 3).

Анализируя вышеизложенное, отметим, что достигнуто повышение АА бактерий путем обработки их компонентами культуры,

по отношению к которой добиваются повышения активности, т.е. индикаторной культуры. При использовании в качестве индикаторного штамма *S. aureus*, наиболее выраженной способностью повышать антагонизм обладали фрагменты его клеточной стенки. Действие же экзометаболических приводило как к повышению АА, так и к ее понижению. Не исключено, что обнаруженные свойства компонентов *S. aureus* можно использовать для усиления антагонистического действия пробиотиков или представителей индигенной флоры при санации бактерионосительства.

Список использованной литературы:

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Гильмутдинова Ф.Г. и др. Экология микроорганизмов человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2006.
2. Глушанова Н.А. О биосовместимости пробиотиков с индигенной микрофлорой хозяина // Сб. материалов конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания». М., 2004. С. 23.
3. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. СПб.: ООО «Нева-Люкс», 2001.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. школа, 1990.
5. Определитель бактерий Берджи. В 2 тт. Т.2. Пер. с англ. М.: Мир, 1997.
6. Патент РФ №2175673 от 07.03.2000 / Бухарин О.В., Забирова Т.М., Чертков К.Л., Черкасов С.В., Иванов Ю.Б.
7. Brurberg M. B., Nes I.F., Eijsink V. G. H. // Mol. Microbiol. 1997. V.26. P. 347-360.
8. Kleerebezem M., Quadri L. E. N., Kuipers O. P., de Vos W. M. // Mol. Microbiol. 1997. V.24. P. 895-904.
9. Melis G. B., Ibba M. T., Steri B. et. al. Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment // Minerva Ginecol., 2000. V. 34. P. 111-121.

Статья рекомендована к публикации 04.05.07