

УСЛОВИЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ СТИМУЛЯЦИИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОБИОТИКОВ

Установлена возможность повышения антагонистической активности штаммов-пробиотиков различными клеточными компонентами пробиотических бактерий. Выявлено влияние условий культивирования штамма-антагониста и бактерии-регулятора на стимулирующую антагонизм активность. Обнаруженные эффекты необходимо учитывать при изыскании, получении и использовании микробных стимуляторов бактериального антагонизма. Метаболиты и пептидогликаны бактерий-стимуляторов перспективны для создания новых лечебно-профилактических биопрепаратов.

Ключевые слова: антагонизм, пробиотики.

Введение

Для лечения и профилактики инфекционных заболеваний используют препараты на основе живых бактерий и их метаболитов [1, 2]. Поиск способов и средств повышения их эффективности позволит улучшить качество лечебных мероприятий с использованием биопрепаратов, что является актуальной задачей.

Ранее нами был описан способ повышения антагонистической активности (АА) бактерий, который состоит в усилении активности представителей нормофлоры и пробиотиков клеточными компонентами *Staphylococcus aureus* [4]. Представляет интерес изучение влияния на микробный антагонизм других бактерий, а также условий действия регуляторов АА.

Цель настоящего исследования: изучить влияние клеточных компонентов штаммов-пробиотиков на антагонистическую активность пробиотических бактерий в зависимости от условий культивирования микроорганизмов.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы-пробиотики *Lactobacillus plantarum* («Лактобактерин»), *Bifidobacterium longum* («Бифидоформ»), *Enterococcus faecium* («Бифидоформ»). Индикаторная культура – клинический изолят, идентифицированный как *S. aureus*, на основании его тинкториальных, морфологических и биохимических характеристик по Берги, с использованием тест-систем Api ID 32 Staph («Bio Merieux»).

Инкубирование бактерий проводили микроаэрофильно, при 37 °С, на средах Мана-Рогоза-Шарпа (МРС, «HiMedia») и 1,5% пептонной воде (ПВ; НПО «Питательные среды»), на примере которых изучали влияние различных условий культивирования микроорганизмов – штам-

ма-антагониста и бактерии-стимулятора – на действие регуляторов антагонизма.

Для определения влияния штаммов-пробиотиков на АА пробиотических бактерий использовали метод, в котором тестировали на бактерицидность культуральную жидкость исследуемой культуры, обработанной метаболитами и пептидогликанами пробиотических штаммов [4]. Пептидогликаны бактерий получали по Герхардту [3] с дополнительной обработкой микробной биомассы смесью этилового спирта и хлороформа, щелочью и ацетоном [4]. Конечная концентрация пептидогликана в среде культивирования – 130 мкг/мл.

Признак выражали в процентах угнетения прироста КОЕ индикаторной культуры за 1 час инкубации с метаболитами антагониста, по сравнению с приростом КОЕ при влиянии среды роста антагониста.

Для определения способности молочнокислых бактерий регулировать антагонизм культуральные жидкости последних нейтрализовали до рН МРС (цельные обладали выраженным антимикробным действием). Совокупное действие антагониста и бактерии-регулятора исключали путем изучения АА смеси 1:1 метаболитов антагониста и бактерии-регулятора, разбавленных соответствующей средой культивирования до концентрации в опытных пробах. Все эксперименты проводили в двух сериях при двукратном воспроизведении. Результаты обрабатывали с использованием критерия Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При изучении влияния штаммов-пробиотиков на АА пробиотических бактерий было обнаружено, что стимулирующим антагонизм

действием обладали метаболиты и пептидогликаны изученных микроорганизмов. Повышение АА не было связано с совокупным действием антимикробных веществ бактерии-регулятора и штамма-антагониста или со стимуляцией ростовых характеристик антагониста. На определение усиливающей антагонизм активности исследуемой культуры-регулятора влияли условия ее культивирования и условия роста обрабатываемого штамма-антагониста.

При исследовании способности *E. faecium* повышать АА молочнокислых бактерий выявлено, что на выраженность усиливающей антагонизм активности оказывает влияние среда культивирования бактерии-стимулятора. Метаболиты энтерококка, выращенного в ПВ, повышали проявление антагонизма у *L. plantarum* – с $88,5 \pm 1\%$ в контроле до $96,5 \pm 1,5\%$ в опыте ($p < 0,05$), но оказывали индифферентное действие в отношении антагонизма *B. longum*. При культивировании *E. faecium* в МРС, наоборот, стимулирующая активность его метаболитов в отношении антагонизма *L. plantarum* не проявлялась, тогда как в отношении *B. longum* наблюдали резкое увеличение ее антимикробной активности – с $68 \pm 2\%$ в контроле до $88,5 \pm 3,5\%$ в опыте ($p < 0,05$). Фрагменты пептидогликана *E. faecium* независимо от условий культивирования бактерии-регулятора достоверного влияния на антагонизм изученных молочнокислых бактерий не оказывали.

При исследовании способности молочнокислых бактерий стимулировать антагонизм *E. faecium* выявлено, что действие микробных стимуляторов антагонизма зависело от условий культивирования антагониста. Метаболиты лакто- и бифидобактерии достоверного влияния на выраженность АА энтерококка не оказывали. Пептидогликаны *B. longum* и *L. plantarum* стимулировали антагонизм *E. faecium*, но только при культивировании энтерококка в ПВ, но не в МРС. При обработке *E. faecium* пептидогликанами *B. longum* и *L. plantarum* и его росте в МРС уровень АА составил 67 ± 1 и $58 \pm 2\%$ соответственно, против $64 \pm 7\%$ в контроле ($p > 0,05$). При обработке пептидогликанами *B. longum* и *L. plantarum* и росте энтерококка в ПВ уровень его антимикробной активности повышался и составил 50 ± 2 и $52,5 \pm 0,05\%$ соответственно, против $7,2 \pm 4,8\%$ в контроле ($p < 0,05$).

Таким образом, установлена возможность повышения АА штаммов-пробиотиков различными клеточными компонентами пробиотических бактерий. На выявление стимулирующей антагонизм активности влияют условия культивирования бактерии-регулятора и штамма-антагониста, что необходимо учитывать при изыскании, получении и использовании микробных стимуляторов бактериального антагонизма.

Условия микробной стимуляции АА бактерий могут быть разнообразными и в каждом случае требуют специального рассмотрения. К усилению антагонистических свойств культуры могут приводить как условия улучшения ее метаболических и ростовых характеристик [2, 7], так и действие специфических индукторов [6-8].

Влияние условий культивирования бактерии-регулятора на проявление им стимулирующей антагонизм активности можно объяснить различиями в природе и/или уровне продукции предполагаемого стимулятора. При росте *E. faecium* в МРС-среде, богатой глюкозой, может образовываться ацетат [7], для которого описаны стимулирующие рост и антагонизм свойства [2]. Также у исследуемого энтерококка возможно наличие специфических регуляторных молекул – при росте в ПВ наблюдали «clump»-эффект, или агрегацию, которая опосредуется феромонами [5, 7]. В МРС-среде это явление проявлялось слабо, что совпадало со снижением стимулирующей активности метаболитов *E. faecium* в отношении антагонизма лактобактерии. Следует отметить, что описана способность энтерококка индуцировать синтез бактериоцина у *L. plantarum* [8]. Не исключено, что проявление стимулирующего действия бактерии-регулятора зависит от вида «антагониста-мишени», что показано выше на примере действия *E. faecium* на антагонизм *B. longum* и *L. plantarum*.

Влияние условий культивирования антагониста на выявление стимулирующей антагонизм активности бактерии-регулятора можно объяснить влиянием компонентов питательной среды, которые могут препятствовать действию или определению действия индукторов антагонизма. В настоящем исследовании наблюдали, что усиливающий антагонизм эффект пептидогликана проявлялся только при росте *E. faecium*-антагониста в пептонной воде, но не в МРС-среде. МРС нивелирует действие стимулятора АА. Данный эффект можно объяснить

тем, что в богатой питательными веществами среде образуется большое количество антимикробных веществ, на фоне которого стимуляция АА достоверно не выявляется. Также МРС может ингибировать стимулирующую антагонизм активность пептидогликана за счет углеродной катаболитной репрессии антагониста, при которой глюкоза, содержащаяся в МРС, затрудняет действие регулятора (в данном случае аминокислота клеточных стенок) [5]. Последнее подтверждается тем, что добавление в ПВ всего 10% МРС «отменяет» усиливающий антагонизм эффект пептидогликана.

Полученные данные могут быть использованы для разработки новых классов пре-, про- и синбиотиков или способов нового применения уже существующих, действие которых будет основано не на прямом антимикробном эффекте или стимуляции роста, а на способности усиливать антагонизм определенных представителей индигенной микрофлоры индивидуума или пробиотических бактерий. Применение микробных стимуляторов бактериального антагонизма возможно в здравоохранении для повышения качества лечебных мероприятий с использованием биопрепаратов.

Список использованной литературы:

1. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиол. 2004, №1, С. 36-43.
2. Вахитов Т.Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболических веществ на внутрипопуляционном и межвидовых уровнях. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. 2007.
3. Методы общей бактериологии: в 3 тт. Т. 2 / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: Мир. 1984, 472 с.
4. Семенов А.В. Способ повышения антагонистической активности бактерий // Вестник Оренбургского гос. ун-та. 2007, №6, С. 100-103.
5. Современная микробиология: Прокариоты: В 2-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленглера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005, 496 с.
6. Bronneke V., Fiedler F. Production of bacteriolytic enzymes by *Streptomyces globisporus* regulated by exogenous bacterial cell walls // Appl. Environ. Microbiol. 1994, V. 60, №3, P. 785-791.
7. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Third Edition, Marcel Dekker, Inc. New York – Basel. 2004.
8. Maldonado A., Ruiz-Barba, J. L., and Jimenez-Diaz, R. Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria // Arch. Microbiol. 2004, V. 18. P. 8-16.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №08-04-99085, р_офи.

Semenov A.V. CONDITIONS FOR DETECTION OF MICROBIAL STIMULATION OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PROBIOTICS

The possibility of the increase the antagonistic activity of probiotic-strains with different cellular components of probiotic bacteria is determined in this article. The influence of cultivation conditions of strain-antagonist and bacteria-regulator on the stimulating activity of antagonism is revealed here. These effects must be considered at identifying, obtaining and using of microbial stimulants of bacterial antagonism. Metabolites and peptidoglycans of bacteria-stimulants are perspective for creation of new therapeutic and prophylactic biological products.

Key words: antagonism, probiotics.

Сведения об авторе: Семёнов Александр Васильевич сотрудник лаборатории по изучению механизмов формирования микробиоценозов человека Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, кандидат биологических наук
460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел.: (3532) 775417, e-mail: lever3@yandex.ru