

УДК 579.24, 579.222

UDC 579.24, 579.222

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ И ПАТОГЕННЫХ
БАКТЕРИЙ НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ
АКТИВНОСТЬ *LACTOBACILLUS*
ACIDOPHILUS Д№75**

**THE EFFECT OF PROBIOTIC AND
PATHOGENIC BACTERIA METABOLITES ON
ANTAGONISTIC ACTIVITY OF
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS D № 75**

Вахитов Тимур Яшерович
д.б.н

Vakhitov Timur Yasherovich
Dr.Sci.Biol.

Вербицкая Наталья Борисовна
к.б.н.

Verbitskaya Natalya Borisovna
Cand.Biol.Sci.

Добролеж Ольга Васильевна

Dobrolezh Olga Vasilievna

Полевая Елена Валерьевна
к.ф.н.

Polevaya Elena Valeryevna
Cand.Pharm.Sci.

Кобатов Алексей Иванович
к.т.н.

KobatoV Aleksey Ivanovich
Cand.Tech.Sci.

*Государственный научно-исследовательский
институт особо чистых биопрепаратов, Россия,
197110, Санкт-Петербург, ул.Пудожская, д.7
nata_verb@yahoo.com*

*State research institute of pure biopreparations, Saint-
Petersburg, Russia*

Исследовано влияние композиций бактериальных метаболитов Aktoflor и Patogen на антагонистическую активность *L.acidophilus* Д№75. Показано, что обе композиции метаболитов стимулируют интегральную антагонистическую активность (АА) штамма за счет индукции синтеза бактериоцина и снижения в популяции доли низкоактивных клонов. Показано преимущество метаболитов пробиотических бактерий Aktoflor. Результаты исследования могут быть использованы для повышения пробиотического потенциала бактериальных препаратов

In the article we investigated the effect of the bacterial metabolites compositions (Aktoflor and Patogen) on antagonistic activity of *L.acidophilus* D № 75. It was shown the both compositions stimulate integrated antagonistic activity of *L.acidophilus* D № 75 by inducing the synthesis of the bacteriocin and decreasing the proportion of low active clones in the population. We have also shown the advantage of probiotic bacteria metabolites (Aktoflor). The results can be used to enhance the probiotic potential of the bacterial preparations

Ключевые слова: АНТАГОНИЗМ, ФАКТОРЫ АНТАГОНИЗМА, МЕТАБОЛИТЫ ПРОБИОТИЧЕСКИХ И ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, БАКТЕРИОЦИНЫ, ИНДУКЦИЯ

Keywords: ANTAGONISM, ANTAGONISM FACTORS, PROBIOTIC AND PATOGENEC BACTERIA METABOLITES, BACTERIOCINES, INDUCTION

Антагонистические свойства бактерий являются одним из механизмов формирования и функционирования микробиоценозов [1]. В большинстве случаев антагонистическое действие бактерий опосредовано образованием специфических продуктов обмена (токсинов, антибиотиков, литических ферментов, бактериоцинов), которые могут синтезироваться как в монокультурах, так и в присутствии гетерологичных клеточных популяций. При этом при совместном культивировании антагонистическая активность выявляется чаще и с большей выраженностью [2]. Стимуляция

синтеза бактериоцинов у лактобацилл в присутствии неродственных бактерий или, в ряде случаев, их метаболитов впервые была обнаружена в 1989 г. [3]. Авторы показали, что биосинтез бактериоцина рейтерина у *L. reuteri* 1063 стимулировался при прямом взаимодействии продуцента с бактериями, относящимися к разным группам (р. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*). Индукция биосинтеза рейтерина в присутствии клеток *E. coli* наблюдалась начиная с соотношения *E. coli*/*L. reuteri* 0,5-1,0, а ее эффективность возрастала при увеличении концентрации культуры-индуктора (*E. coli*). При определенных условиях наблюдали 5-кратное увеличение синтеза бактериоцина. *L. plantarum* NC8 также синтезировал бактериоцин только в присутствии культуры-индуктора (фильтраты культуральных сред культур-индукторов и диализное культивирование этих культур с антагонистом данного эффекта не обеспечивали). Всего в качестве индукторов было исследовано 82 штамма, из них 41 проявляли активность. Минимальное количество индуцирующих клеток составило 10^4 , а максимальный эффект наблюдался при 10^6 клеток с дальнейшим насыщением и независимо от природы культуры-индуктора [4].

В наших экспериментах, однако, на примере симбиотической культуры *L. acidophilus* «Витафлор» была обнаружена стимуляция синтеза бактериоцина фильтратами культуральной среды *E. coli* М-17 (Актофлор) и синтетической композицией выделенных из нее низкомолекулярных метаболитов (Актофлор-С). Коэффициент стимуляции антагонизма лактобацилл к *E. coli* М-17 зависел от концентрации, состава, соотношения и стереоизомерных форм метаболитов и варьировался от 1,5 до 7,9 [5].

Проявление антагонистической активности у бактерий зависит от ряда факторов, среди которых, прежде всего, следует назвать разнообразие видов антагониста и жертвы в конкретных условиях внешней среды [6]. В

работах А.В. Семенова, исследовавшего влияние фильтратов культуральных сред гетерологичных популяций, было показано, что в зависимости от видовых особенностей участников взаимодействий активность штамма-антагониста может оставаться на базальном уровне, повышаться или понижаться. Кроме того, возможен вариант инверсии – стимуляция антагонистом роста чувствительной культуры [7-9]. Так, фильтраты культуральной среды *C. albicans* стимулировали антагонизм *S. aureus* к *L. acidophilus*, *L. casei* и *S. hominis*, а фильтраты *E. agglomerans* ингибировали антагонизм *S. aureus* к *S. hominis*, инвертировали к *L. acidophilus* и обладали индифферентным эффектом к *L. casei* [8]. Результаты исследований позволили автору сформулировать критерии отбора штаммов для создания биопрепаратов, состоящих из антагониста и его стимулятора. На основе взаимной стимуляции антагонизма предложена новая комбинация бактерий из известных пробиотиков (*E. coli* М-17 и *E. faecium*), превосходящая по антагонистической активности монопрепараты [7]. Вместе с тем, недостатком полиштаммовых пробиотиков может быть их поливариантное терапевтическое действие [10]. Для стандартизации терапевтического действия бактериальных пробиотиков предпочтительнее регулировать их антагонистическую активность комплексами метаболитов определенного состава.

Целью работы являлось исследование влияния **стандартизованных комплексов метаболитов** гетерологичных бактерий на АА штамма *L. acidophilus* Д№75, являющегося производственным штаммом препарата Витафлор-форте [10], в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Культуры бактерий. Объектами исследования являлись производственный штамм препарата Витафлор-форте *Lactobacillus acidophilus* Д№75 и условно-патогенные тест-культуры (*Escherichia coli*

O75, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Все культуры хранили в сублимированном виде.

Питательные среды. В работе использовали жидкую, полужидкую и плотную питательные среды семейства МРС (Манна-Рогозы-Шарпа) следующего состава, г/л:

Среда МРС-1 (жидкая): панкреатический гидролизат казеина (Serva) – 10,0; дрожжевой экстракт (BBL) – 8,0; peptonized milk (Himedia) – 47,0; глюкоза – 20,0; L-цистина гидрохлорид – 0,1; K_2HPO_4 – 2,0; Mg_2SO_4 – 0,2; $MnSO_4$ – 0,02; tween-80 – 1,0 мл. pH после стерилизации - 6,75.

Среды МРС-2 (полужидкая) и МРС-5 (плотная) отличаются от среды МРС-1 наличием агара (4,0 и 18,0 г/л) соответственно.

Standart Nutrient Agar (Serva, США) готовили из коммерческой сухой среды в соответствии с инструкцией.

Все среды стерилизовали автоклавированием при избыточном давлении 0,5 атм. в течение 15 мин.

Комплекс метаболитов пробиотических бактерий (Aktoflor, включающий основные компоненты препарата Актофлор[®]-С), г/100 мл : метионин – 0,34; формиат натрия – 1,55; янтарная кислота – 1,62; натрия ацетат – 11,61; вода очищенная – до 100 мл.

Комплекс метаболитов патогенных бактерий (Patogen), г/100 мл: аланин – 0,17; серин – 0,21; метионин – 0,28; цистеин – 0,23; глицин – 0,15; натрия ацетат – 7,70; натрия формиат – 0,51; натрия лактат – 1,68; вода очищенная – до 100 мл.

В предварительных экспериментах было показано, что метаболиты в заданных концентрациях не оказывали влияния на рост тест-культур на твердых и жидких средах.

Условия культивирования штамма Д75 в среде МРС-1 с комплексами Aktoflor и Patogen.

1) Выращивание штамма при высокой плотности засева (1×10^7 КОЕ/мл).

Штамм засевали в среду МРС-1 с 1 мг/мл соответствующего комплекса метаболитов. Выращивание проводили в плоскодонных полистироловых 96-ячеечных планшетах при 37°C. Динамику роста лактобацилл оценивали по величине оптической плотности на фотометре для микроплат BioTek ELx800™ на длине волны 630 нм. Контролем служил рост штамма в среде без добавок метаболитов.

2) Выращивание штамма при низкой плотности засева (не более 10 КОЕ/мл).

Штамм Д75 засевали в среду МРС-1 с 1 мг/мл соответствующего комплекса метаболитов. Динамику роста лактобацилл оценивали по количеству жизнеспособных клеток, определяемому высевом в полужидкую среду МРС-2. Контролем служил рост штаммов в среде без добавок метаболитов.

Получение фильтратов культуральной среды штамма Д№75. Штамм выращивали в среде МРС-1 и в МРС-1 с 1 мг/мл исследуемых метаболитов (37°C, 24 часа, плотность засева 1×10^7 КОЕ/мл); клетки осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 15 мин при 4°C). В полученных супернатантах устанавливали значение рН 5,8 подтитровкой растворами NaOH, после чего фильтровали через мембраны «Millipore» с диаметром пор 45 мкм. Были получены следующие варианты фильтратов:

Фильтрат 1 - фильтрат штамма Д№75, выращенного в среде МРС-1 без добавок метаболитов;

Фильтрат 2 - фильтрат штамма Д№75, выращенного в среде МРС-1 с добавкой соответствующего комплекса метаболитов в начале культивирования;

Фильтрат 3 - фильтрат штамма Д№75, выращенного в среде МРС-1 с добавкой соответствующего комплекса метаболита на 8-ом часу культивирования (начало стационарной фазы).

Определение антагонистической активности штамма Д№75. АА определяли *in vitro* с использованием диффузионных методов и методов тестирования в жидких средах.

1) Метод перпендикулярных штрихов.

В среду МРС-5 вводили добавки комплексов Aktoflor и Patogen в разных концентрациях и разливали в чашки Петри (20 мл). В контрольные чашки в эквивалентном объеме вводили дистиллированную воду. После высыхания чашек на них по диаметру высевали штамм Д№75 штрихом бактериологической петлей диаметром $(3,5 \pm 0,5)$ мм. Посевы инкубировали при 37°C . На 1-4 сутки производили подсев тест-культур петлей диаметром $(1,75 \pm 0,25)$ мм штрихом в направлении от зоны роста исследуемого штамма, не касаясь ее и перпендикулярно ей. Посевы инкубировали при 37°C . Результаты учитывали через 1 сутки по величине зоны ингибирования роста тест-культур. Размер зоны ингибирования (R) принимали за радиус эквивалентной площади ингибирования (S), $S = \pi R^2$. Индексы стимуляции АА рассчитывали путем деления площади ингибирования роста тест-культур на среде с добавками комплексов на соответствующую площадь на среде без добавок метаболитов. Средний индекс стимуляции определяли для 3-х тест-культур, посеянных после 1 суток выращивания штриха Д№75 на одну чашку.

2) Определение АА отдельных клонов штамма Д№75 методом трехслойного агара.

В нижний слой среды МРС-5 (15 мл) вводили 1,0 мг/мл комплекса Aktoflor. На его поверхность высевали 5-15 клеток штамма Д№75, заливали 5 мл среды МРС-5 и инкубировали посевы 2 суток при 37°C . В 5 мл расплавленной и охлажденной до 42°C среды Standart Nutrient Agar

вносили 10^6 КОЕ *S. aureus* и распределяли ее по поверхности второго слоя агара МРС-5. Посевы инкубировали 24 часа при 37°C, после чего измеряли радиус и рассчитывали площади зон подавления роста *S. aureus* отдельными колониями штамма Д№75. Контролем служили чашки, в нижний слой которых не вносили метаболиты пробиотических бактерий.

3) Выращивание тест-штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *P.aeruginosa* ATCC 27853 в фильтрах культуральной среды штамма Д№75.

Выращивание тест-штаммов проводили при 37°C в плоскодонных полистироловых 96-ячеечных планшетах. Исходный засев составлял $(5-6) \times 10^7$ КОЕ/мл. Контролем служил рост тест-штаммов в среде МРС-1 при рН 5,8.

4) Определение скорости гибели *S. aureus* в фильтрах 1 и 2 без коррекции рН.

Фильтраты 1 и 2 получали, как описано выше, но без предварительной коррекции рН. Конечные значения рН фильтратов составляли 3,84- 3,91. В фильтраты вносили 18-часовую культуру *S. aureus* до конечной плотности 10^3 КОЕ/мл и инкубировали при 37°C в течение 4-х часов. Титр жизнеспособных клеток *S. aureus* определяли на Standart Nutrient Agar. Индексы ускорения гибели *S. aureus* рассчитывали путем деления титра *S. aureus* в культуре без добавок комплексов на соответствующий титр в культуре с добавками комплексов.

Определение содержания молочной кислоты. Процентное содержание DL-молочной кислоты определяли по значению титруемой кислотности (°Т) образцов, так как штамм Д№75 является гомоферментативным [11].

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах методом трехслойного агара было показано, что АА штамма Д№75 стимулируется отдельными колониями *S.*

aureus ATCC 25923 при отсутствии прямого контакта между культурами. АА штамма Д№75 достоверно возрастала при величине «нагрузки» равной всего 25 колониям *S. aureus* ATCC 25923 на 1 чашку (индекс стимуляции АА был равен 1,14). По мере увеличения «нагрузки» до тысячи колоний индекс стимуляции возрастал до значения 5,72. Это согласуется с данными литературы о влиянии метаболического пула гетерологичных бактерий на уровень АА лактобацилл.

Состав пула метаболитов ряда гетерологичных бактерий был нами подробно изучен и на основании полученных данных были составлены модельные комплексы метаболитов пробиотических (Aktoflor) и патогенных (Patogen) штаммов [12-14]. В настоящей работе эти комплексы были использованы для изучения механизмов гетерологической индукции антагонистической активности. АА определяли *in vitro* с использованием диффузионных методов (метод перпендикулярных штрихов, метод трехслойного агара) и методов тестирования в жидких средах (выращивание и инкубация тест-штаммов в фильтрах культуральной среды штамма Д№75).

Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на АА штамма Д№75 на плотной среде. Метод перпендикулярных штрихов было показано, что на среде МРС-5 штамм Д№75 проявлял выраженный антагонизм ко всем тест-культурам (табл. 1).

Таблица 1 - Средняя площадь зоны задержки роста тест-культур, см²

Время выращивания штриха штамма Д№75, сутки	Средняя площадь зоны задержки роста тест-культур, см ²		
	<i>E.coli</i> O75	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	3,14	6,15	0,64
2	12,56	28,26	3,80
3	21,23	>38,47	4,52
4	>38,47	>38,47	4,52

Уровень АА штамма Д№75 возрастал с увеличением продолжительности его выращивания. Чувствительность тест-культур возрастала в ряду: *P. aeruginosa* ATCC 27853 > *E.coli* O75 > *S. aureus* ATCC 25923. Селекции устойчивых клонов не отмечалось, что свидетельствовало о бактерицидном действии антагониста на все тест-культуры. Добавки метаболитов стимулировали АА на всех сроках выращивания штамма Д№75 (таблицы 2 и 3).

Таблица 2 – Зависимость индекса стимуляции АА штамма Д№75 от концентрации комплекса Aktoflor

Концентрация комплекса Aktoflor, мг/мл агара	Индекс стимуляции АА на разных сроках выращивания штамма Д№75											
	<i>E.coli</i> O75				<i>S. aureus</i> ATCC 25923				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			
	Сутки											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	1	1	1	-	1	1,00	-	-	1	1	1	1
0,25	1	1,69	1,16	-	1,15	>1,36	-	-	1,23	1,19	1,17	1
0,5	1	1,82	>1,81	-	1,65	>1,36	-	-	1,77	1,19	1,17	1,36
1,0	1,69	>3,06	>1,81	-	2,25	>1,36	-	-	1,77	1,19	1,36	1,46
2,0	4,41	>3,06	>1,81	-	>6,26	>1,36	-	-	3,97	1,40	1,56	1,78

Комплекс Aktoflor повышал индекс стимуляции АА в 4-6 раз, комплекс Patogen – не более, чем в 2,4 раза. Aktoflor значительно повышал средний индекс стимуляции АА при концентрации 0,25 мг/мл, Patogen - при 0,5 мг/мл.

Таблица 3 – Зависимость индекса стимуляции АА штамма Д№75 от концентрации комплекса Patogen

Концентрация комплекса Patogen, мг/мл агара	Индекс стимуляции АА на разных сроках выращивания штамма Д№75											
	<i>E.coli</i> O75				<i>S. aureus</i> ATCC 25923				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853			
	Сутки											
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	1	1	1	-	1	1	-	-	1	1	1	1
0,25	1	1	1	-	1	1	-	-	1	1	1	1
0,5	1,21	1,28	1,33	-	1,15	1	-	-	1,23	1	1	1
1,0	1,69	1,56	1,42	-	1,31	1	-	-	2,41	1,17	1	1
2,0	1,96	2,25	1,81	-	1,65	>1,36	-	-	2,41	1,19	1,17	1,27

При внесении комплекса Patogen в концентрациях 1-2 мг/мл наблюдалось насыщение среднего индекса стимуляции. При внесении комплекса Aktoflor в максимально исследованной концентрации (2 мг/мл) признаки насыщения среднего индекса стимуляции отсутствовали (рис. 1).

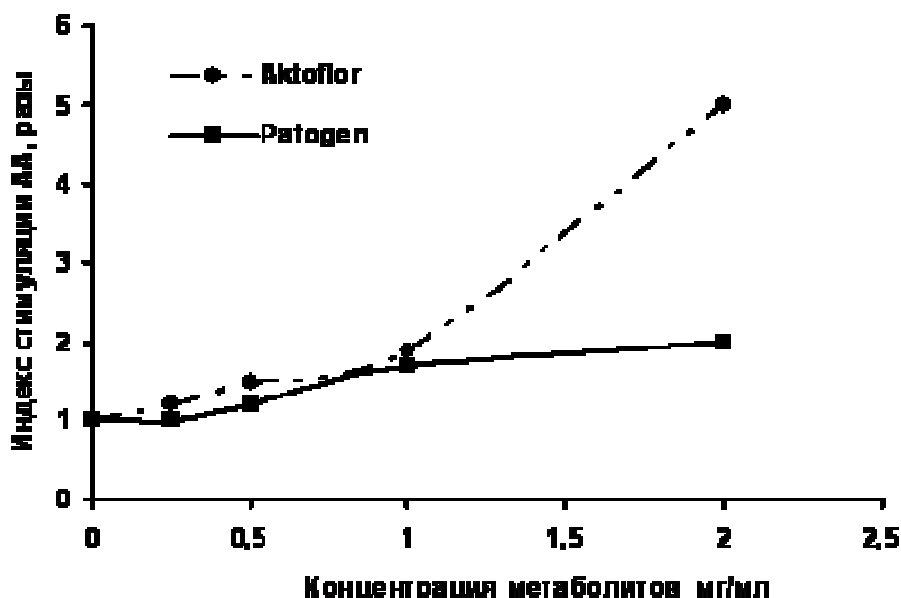


Рисунок 1 – Зависимость среднего индекса стимуляции АА штамма Д№75 от концентрации комплексов Aktoflor и Patogen (время выращивания штамма Д№75 - 1 сутки)

Поскольку метод перпендикулярных штрихов дает представление только об уровне интегральной АА бактериальной популяции, в дальнейшей работе было исследовано влияние комплексов на АА отдельных клонов.

Влияние комплекса Aktoflor на уровень АА отдельных клонов штамма Д№75. Было установлено, что популяция штамма Д№75 является гетерогенной по уровню АА к *S.aureus*. У 28% низкоактивных клонов площадь задержки роста *S.aureus* варьировалась от 0,03 см² до 2,11 см², а у 72% активных клонов от 5,72 см² до 9,28 см². Средняя площадь задержки роста *S.aureus* единичной колонией всей популяции штамма Д№75 составляла 5,31 см², причем у низкоактивных клонов она составляла 0,64 см², а у активных клонов – 7,37 см². При добавке комплекса Aktoflor

средняя площадь задержки роста *S.aureus* единичной колонией всей популяции возрастала до 16,61 см², а клоны с низким уровнем АА практически отсутствовали.

Таким образом, эксперименты на плотной среде показали, что исследуемые комплексы стимулировали интегральную АА. Кроме того комплекс Aktoflor снижал степень гетерогенности популяции штамма Д№75 по данному признаку. В дальнейших экспериментах исследовали влияние комплексов метаболитов на факторы неспецифической и специфической АА (кислотность, выход молочной кислоты, скорость роста, продукцию бактериоцина) в жидкой среде МРС-1.

Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на динамику рН и продукцию молочной кислоты в жидкой среде. Штамм Д№75 является сильным кислотообразователем, о чем свидетельствует снижение рН среды на 2 ед. в процессе культивирования за счет образования молочной кислоты. Добавка комплексов метаболитов не оказывала влияния на динамику кислотности и накопление молочной кислоты (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на динамику рН и выход молочной кислоты в процессе роста штамма в среде МРС-1 (исходный засев – 1×10^7 КОЕ/мл, концентрация комплексов – 1,0 мг/мл, исходное значение рН - 6,75)

Штамм	Добавка	Время роста, часы		
		4	8	24
рН	Контроль	5,80	4,45	3,84
	Aktoflor	5,75	4,50	3,88
	Patogen	5,73	4,47	3,91
Молочная кислота, %	Контроль	0,90	1,19	1,78
	Aktoflor	0,92	1,15	1,71
	Patogen	0,92	1,17	1,67

Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на рост штамма Д№75 в жидкой среде. При высокой плотности засева (10^7 КОЕ/мл) добавки комплексов не оказывали влияния на динамику роста и выход биомассы, а при низкой плотности засева (не более 10 КОЕ/мл) ускоряли рост штамма. Первое удвоение числа клеток в среде с добавкой происходило при этом через 8 часов, а в контроле – только через 11 часов (табл. 5). Таким образом, комплексы метаболитов ускоряли переход лактобацилл в активное репродуктивное состояние.

Таблица 5 – Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на рост штамма Д№75 в среде МРС-1 при низкой плотности засева (5 КОЕ/мл)

Время роста, час	КОЕ/мл		
	Контроль	Aktoflor	Patogen
0	4	4	4
4	4	3	6
5	5	6	4
6	6	6	2
7	5	5	7
8	5	10	11
9	4	19	21
10	6	45	37
11	14	81	64
12	31	>100	>100

Влияние комплексов метаболитов на бактериоциногенную активность штамма Д№75 в среде МРС-1 оценивали по динамике роста и скорости гибели *S.aureus* ATCC 25923 в фильтрах культуральных сред антагониста.

Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на бактериоциногенную активность штамма Д№75. Ранее методами гель-хроматографии и ионообменной хроматографии было установлено, что при выращивании в среде МРС-1 штамм Д№75 синтезирует бактериоцин класса 2 подкласса 2а с молекулярной массой порядка 6 кДа. Его биосинтез являлся конститутивным и не зависел от наличия в среде гетерологичных бактериальных популяций. Активность бактериоцина зависела от pH –

практически отсутствовала при рН 6,75 и достигала максимума в диапазоне рН 5,0-5,9 [5].

Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на бактериоциногенную активность штамма исследовали при значениях рН 5,8, поскольку более низкие значения рН ($\leq 5,5$) существенно ингибировали рост тест-культур. На рисунке 2 показано влияние рН на рост тест-культур в среде МРС-1 на примере *S.aureus* ATCC 25923.

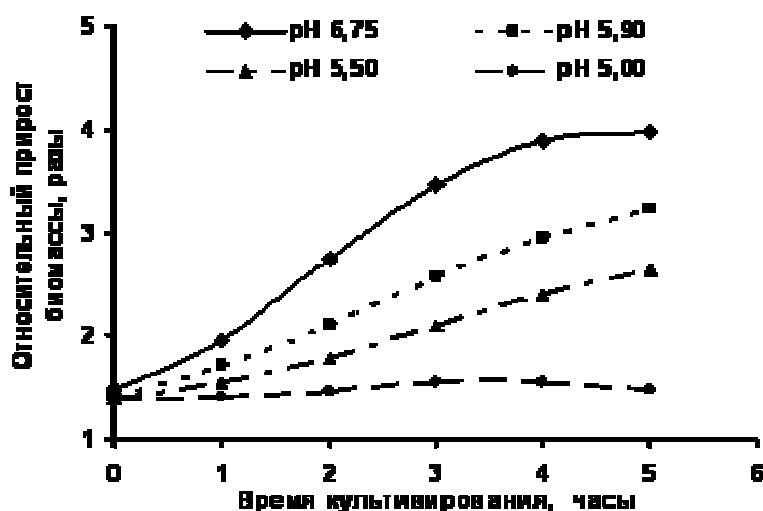


Рисунок 2 – Зависимость роста *S.aureus* ATCC 25923 в среде МРС-1 при различных значениях рН

На рисунках 3 а) и б) видно, что при рН 5,8 фильтрат культуральной среды штамма Д№75, выращенного без добавок комплексов метаболитов (фильтрат 1), подавлял рост *S.aureus*. Добавки комплексов на разных стадиях роста штамма Д-75 (фильтраты 2 и 3) не оказывали существенного влияния на его бактериоциногенную активность.

Аналогичные результаты получены при изучении комплексов на бактериоциногенную активность штамма Д№75 к *P.aeruginosa* (рис. 3 в, г).

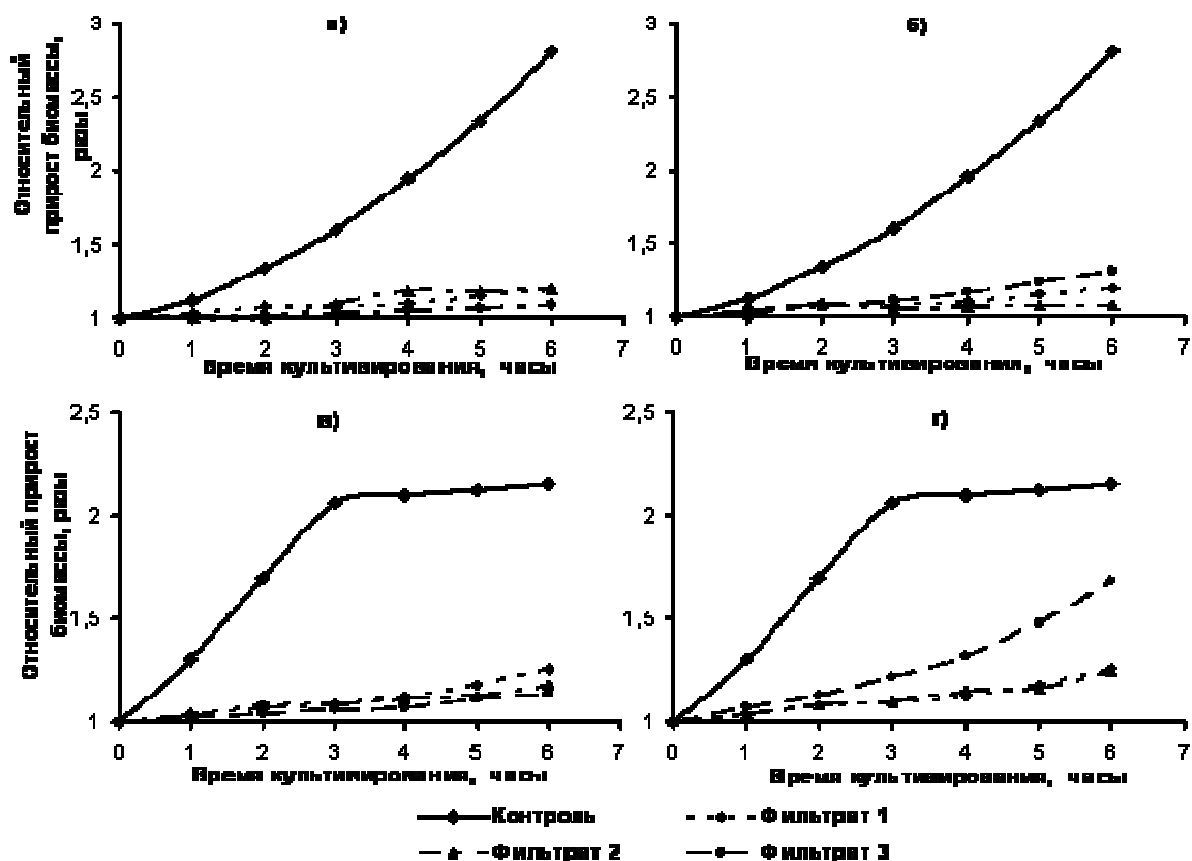


Рисунок 3 – Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на бактериоциногенную активность штамма Д№75 к *S.aureus* (а) и (б) соответственно, к *P.aeruginosa* (в) и (г) соответственно.

Значение индекса стимуляции бактериоциногенной активности во всех экспериментах не превышало 1,35. Более того, при росте *P.aeruginosa* в фильтрате 3 с комплексом Patogen было отмечено снижение бактериоциногенной активности.

Таким образом, в жидкой среде МРС-1 комплексы Aktoflor и Patogen не оказывали влияния на такие факторы интегральной АА штамма Д№75 как скорость роста и выход биомассы при высокой плотности засева, продукцию молочной кислоты и активность конститутивно синтезируемого бактериоцина. Эти результаты не согласуются с приводившимися выше данными о значительной (в 2-5 раз) стимуляции АА метаболитами в экспериментах на плотной среде МРС-5. Можно

предположить поэтому, что комплексы метаболитов индуцируют синтез еще одного бактериоцина или другой субстанции, активность которых проявляется только при значениях рН ниже 5,8 и/или при непосредственном взаимодействии антагониста с тест-штаммами. Для проверки данного предположения исследовали влияние комплексов метаболитов на наличие факторов антагонизма штамма Д№75 в средах при низких значениях рН. Поскольку тест-культуры при этих рН практически не растут, активность бактериоцинов оценивали по скорости гибели *S.aureus* в фильтрах культуральных сред.

Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на скорость гибели *S. aureus* ATCC 25923 в фильтрах культуральных сред штамма Д№75 при низких значениях рН (3,84-3,91). Из рисунка 4 следует, что в данных условиях эксперимента гибель клеток *S. aureus* в контрольном и опытных фильтрах происходила с разной скоростью.

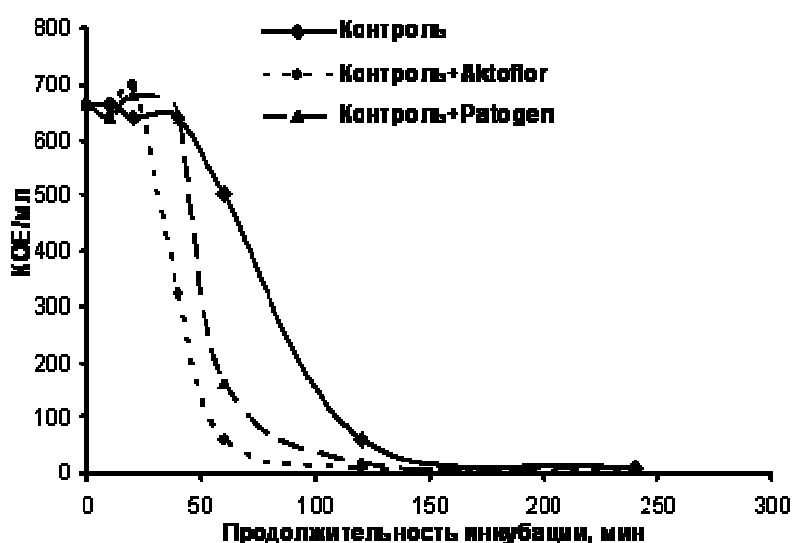


Рисунок 4 – Влияние комплексов Aktoflor и Patogen на скорость гибели *S. aureus* в фильтрах штамма Д№75 (рН 3,84-3,91)

Внесение комплексов в среду выращивания штамма Д№75 приводило к ускорению гибели *S. aureus*. Индексы ускорения гибели в зависимости от продолжительности инкубации варьировались от 1,9 до 9 (табл. 6).

Таблица 6 – Индексы ускорения гибели *S. aureus* в фильтратах культуральных сред штамма Д№75 с комплексами Aktoflor и Patogen

Комплекс метаболитов	рН фильтрата	Продолжительность инкубации <i>S. aureus</i>				
		20 мин.	40 мин.	1 час	2 часа	4 часа
Aktoflor	3,88	1,1	1,9	7,7	9	Полная гибель
Patogen	3,91	1,0	1,0	3,0	2,9	Полная гибель

При этом значения индексов ускорения гибели *S. aureus* комплексом Aktoflor в 2 и более раз превышали значения соответствующих индексов комплекса Patogen. Таким образом, результаты этих опытов подтвердили, что в средах штамма Д№75, выращенного с добавками метаболитов, присутствуют некие дополнительные факторы антагонизма, проявляющие свою активность только при низких значениях рН.

Заключение

Исследование показало, что модельные комплексы метаболитов пробиотических (Aktoflor) и патогенных бактерий (Patogen) повышали интегральную антагонистическую активность штамма Д№75 к тест-штаммам в 2-5 раз, независимо от степени чувствительности тест-штаммов к антагонисту (высокой к *S.aureus* ATCC 25923, промежуточной к *E.coli* O75 или низкой к *P.aeruginosa* ATCC 27853). Индекс стимуляции интегральной АА зависел от вида и концентрации комплексов метаболитов. Показано преимущество комплекса Aktoflor, который значительно повышал средний индекс стимуляции АА при меньших концентрациях и с большей эффективностью по сравнению с комплексом Patogen.

Оба комплекса метаболитов повышали скорость перехода лактобацилл в активное состояние при низкой (не более 10 КОЕ/мл) плотности засева.

Кроме того комплекс Aktoflor снижал гетерогенность популяции по уровню АА.

Комплексы метаболитов не оказывали влияния на такие факторы неспецифического антагонизма как продукция молочной кислоты, скорость роста и выход биомассы при высокой (10^7 КОЕ/мл) плотности засева и не увеличивали специфическую активность конститутивно синтезируемого бактериоцина с оптимумом действия при рН 5,0-5,9.

Вместе с тем среды, полученные при выращивании штамма Д№75 с добавками комплексов метаболитов, ускоряли гибель тест-штаммов при низких значениях рН. Значения индексов ускорения гибели *S. aureus* в фильтрах этих сред были сопоставимы со значениями индексов стимуляции интегральной АА штамма на плотной среде (2-5). Это дает основание предполагать, что метаболиты могут индуцировать синтез второго бактериоцина или другого фактора антагонистической активности, проявляющего активность при более низких значениях рН, чем конститутивно синтезируемый бактериоцин.

Анализ полученных результатов свидетельствует о существовании не менее 3-х различных механизмов стимуляции АА штамма Д№75 комплексами Aktoflor и Patogen:

1. Стимуляция роста лактобацилл при низкой плотности засева.
2. Стимуляция антагонизма клонов с низким уровнем активности.
3. Индукция синтеза неизвестного ранее бактериоцина или другого фактора антагонистической активности, проявляющего активность при низких значениях рН.

Результаты исследования могут быть использованы для повышения пробиотического потенциала бактериальных препаратов.

Работа выполнена по Государственному контракту № 40.003.13.0 от 20 марта 2013 г. «Изучение механизмов действия метаболитных и бактериально-метаболитных препаратов методами геномики и метаболомики. Изучение влияния препаратов на индукцию факторов патогенности и антагонистической активности кишечной микрофлоры»

Список литературы

1. Экология микроорганизмов человека: Учеб.пособие / О.В.Бухарин, А.В. Вальшев, Ф.Г. Гильмутдинова и др. Екатеринбург: УрО РАН, 2006. 546 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: Наука, 2004. 503 с.
3. Chung T.C., Axelsson L., Lindgren S.E., Dobrogosz W.J. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* // *Microbial ecology in health and disease*. 1989. V.2. P. 137-144.
4. Maldonado A., Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J.L. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 5. P. 1556-1564.
5. Вербицкая А. Н. Изучение индукции антагонистической активности *Lactobacillus acidophilus*. Магистерская диссертация. СПб., 2006. 88 с.
6. Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Соколова Г.Г. Антагонистическая активность молочных культур *Lactobacillus acidophilus* по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli* // *Биологические науки*. 2012. Том 3. Вып. 1. С. 41-44.
7. Семенов А.В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях: Дисс. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2009. 135 с.
8. Семенов А.В. Характеристика антагонистической активности *Staphylococcus aureus* при межмикробных взаимодействиях // *Вестник Томского государственного университета. Биология. Биотехнология и микробиология*. 2011. № 3 (15). С. 56–66.
9. Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных взаимодействий // *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал)*. 2013. №1. С. 1-8.
10. Бактериальные пробиотики: биотехнология, клиника, алгоритмы выбора / Л.Н. Петров, Н.Б. Вербицкая, В.П. Добрица, Г.Н. Галкин, Н.Л. Петров. СПб.: ФГУП Гос. НИИ ОЧБ, 2008. 136 с.
11. Тамим А.И., Робинсон Р.К. Йогурт и другие кисломолочные продукты: научные основы и технологии. СПб: Профессия, 2003.664 с.
12. Вахитов Т.Я., Момот Е.Н., Толпаров Ю.Н. Динамика и функции экзометаболитов в процессе роста периодической культуры *Escherichia coli* M-17 // *Журн. микробиол.* 2005. № 1. С. 16-21.
13. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // *Микробиология*. 2006. Т.75. №4. С. 483-488.
14. Полевая Е.В. Разработка состава и технологии биологически активных комплексов на основе бактериальных экзометаболитов: дисс. ... канд. фарм. наук. СПб, 2013. 207 с.

References

1. Jekologija mikroorganizmov cheloveka: Ucheb.posobie / O.V.Buharin, A.V. Valyshev, F.G. Gil'mutdinova i dr. Ekaterinburg: UrO RAN, 2006. 546 s.
2. Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah. M.: Nauka, 2004. 503 s.
3. Chung T.C., Axelsson L., Lindgren S.E., Dobrogosz W.J. In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri* // *Microbial ecology in health and disease*. 1989. V.2. P. 137-144.
4. Maldonado A., Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J.L. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 5. R. 1556-1564.
5. Verbickaja A. N. Izuchenie indukcii antagonisticheskoj aktivnosti *Lactobacillus acidophilus*. Magisterskaja dissertacija. SPb., 2006. 88 s.

6. Irkitova A.N., Kagan Ja.R., Sokolova G.G. Antagonisticheskaja aktivnost' molochnyh kul'tur Lactobacillus acidophilus po odnosheniju k test-shtammam Escherichia coli // Biologicheskie nauki. 2012. Tom 3. Vyp. 1. S. 41-44.
7. Semenov A.V. Harakteristika antagonisticheskoy aktivnosti bakterij pri mezhmikrobnym vzaimodejstvijah: Diss. ... kand. biol. nauk. Orenburg, 2009. 135 s.
8. Semenov A.V. Harakteristika antagonisticheskoy aktivnosti Staphylococcus aureus pri mezhmikrobnym vzaimodejstvijah // Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologija. Biotehnologija i mikrobiologija. 2011. № 3 (15). S. 56–66.
9. Semenov A.V. Antagonizm kak rezul'tat mezhmikrobnym vzaimodejstvij // Bjulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN (jelektronnyj zhurnal). 2013. №1. S. 1-8.
10. Bakterial'nye probiotiki: biotehnologija, klinika, algoritmy vybora / L.N. Petrov, N.B. Verbickaja, V.P. Dobrica, G.N. Galkin, N.L. Petrov. SPb.: FGUP Gos. NII OChB, 2008. 136 s.
11. Tamim A.I., Robinson R.K. Jogurt i drugie kislomolochnye produkty: nauchnye osnovy i tehnologii. SPb: Professija, 2003. 664 s.
12. Vahitov T.Ja., Momot E.N., Tolparov Ju.N. Dinamika i funkcii jezkometabolitov v processe rosta periodicheskoy kul'tury Escherichia coli M-17 // Zhurn. mikrobiol. 2005. № 1. S. 16-21.
13. Vahitov T.Ja., Petrov L.N. Reguljatornye funkcii jezkometabolitov bakterij // Mikrobiologija. 2006. T.75. №4. S. 483-488.
14. Polevaja E.V. Razrabotka sostava i tehnologii biologicheski aktivnyh kompleksov na osnove bakterial'nyh jezkometabolitov: diss. ... kand. farm. nauk. SPb, 2013. 207 s.