

УДК 579.264

Е. Ф. ЧЕРНЯВСКАЯ, А. А. ДУТКО, Н. А. БЕЛЯСОВА

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ СРЕДИ ПРОБИОТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ ШТАММОВ

*Белорусский государственный технологический университет,
Минск, e-mail: enterprise1701u@mail.ru*

(Поступила в редакцию 10.09.2012)

Введение. Антагонизм – один из наиболее широко распространенных способов взаимодействия между микроорганизмами. В наибольшей мере это явление характерно для представителей сложных биоценозов, которые складываются в таких местообитаниях, как почва, водные экосистемы, ризосфера растений, желудочно-кишечный тракт человека и животных. Здесь неизбежно возникает конкуренция за питательные субстраты, которую «выигрывают» виды (штаммы), обладающие наиболее широким арсеналом антагонистических свойств.

Антагонизм выражается в образовании организмами одной популяции веществ, подавляющих развитие членов другой популяции. Одним из наиболее типичных и хорошо изученных примеров антагонизма является продукция антибиотиков. Кроме этого, в качестве антагонистических факторов микроорганизмы синтезируют бактериоцины, ферменты, токсины, а также разнообразные продукты метаболизма (органические и неорганические кислоты, спирты, сероводород, аммиак, жирные кислоты).

Способность продуцировать антагонистические факторы – неременное требование для пробиотических бактерий, которые должны активно ограничивать развитие патогенной и другой нежелательной микробиоты в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека и животных [1]. Известно, что выраженными антагонистическими свойствами характеризуются молочнокислые бактерии, которые продуцируют такие факторы антагонизма, как молочная кислота и разнообразные бактериоцины: низин, диацетин, лактококцин, ацидоцин, лактоцин, плантацин, плантарицин, энтерококцин и др. [2]. Именно это обстоятельство объясняет столь широкое распространение молочнокислых бактерий в составе пробиотических препаратов для лечения и предупреждения дисбактериозов у человека и животных.

Для выявления антагонистических свойств бактерий разработано и используется множество разнообразных подходов, среди которых наиболее объективным считается суспензионный метод совместного инкубирования [3]. Недостатком этого метода является высокая трудоемкость и ряд ограничений использования, связанных с необходимостью дифференцировать тест-бактерии и бактерии-антагонисты при подсчете колоний на плотных средах для определения численности выживших клеток.

Целью нашего исследования являлось совершенствование метода обнаружения антагонистических свойств молочнокислых бактерий – потенциальных пробиотических штаммов.

Материалы и методы исследования. Инкубирование и хранение бактерий осуществляли на плотных и в жидких средах М17 [4], питательном бульоне (ПБ) и питательном агаре (ПА) [5], в обезжиренном молоке [6] с использованием общепринятых методов [6]. Тест-бактериями во всех методах служили санитарно-показательные бактерии *Salmonella typhimurium* TA 100 и *Staphylococcus aureus* 25922. Определение антагонистических свойств молочнокислых бактерий проводили с помощью общеупотребимых методов перпендикулярных штрихов [6] и отсроченного антагонизма [5], а также модифицированных методов лунок и совместного инкубирования.

В модифицированном методе лунок на поверхности плотного питательного агара получали сплошной газон санитарно-показательных бактерий. В агаре вырезали лунки диаметром 8 мм, в которые помещали по 0,1 мл суспензий бактерий-антагонистов, выращенных в среде М17 в течение 72 ч. Инкубировали посевы при 30°C в течение 24 ч. Учитывали наличие и ширину зон задержки роста тест-бактерий.

В модифицированном методе совместного инкубирования получали суточные культуры бактерий-антагонистов и тест-бактерий, которые разводили до 10^4 КОЕ/мл, смешивали в пропорции 1:1, инкубировали в течение 12 и 24 ч. Контролем служили чистые культуры антагонистов и тест-бактерий, которые смешивали с равными объемами среды М17. По истечении времени инкубирования осуществляли высев бактериальных суспензий на питательный агар из кратных разведений в физиологическом растворе. Фактор редукции тест-бактерий (FR) определяли по формуле:

$$FR = \lg\left(\frac{K_k}{K_o}\right)100\%,$$

где K_o – концентрация клеток *St. aureus* при совместном инкубировании с антагонистом, КОЕ/мл; K_k – концентрация клеток *St. aureus* в отсутствие антагониста, КОЕ/мл.

Результаты и их обсуждение. Антагонистические свойства определяли у 50 штаммов мезо- и термофильных молочнокислых бактерий, выделенных в качестве потенциальных пробиотических бактерий из помета цыплят разного возраста Смоленической птицефабрики. Выявление данного показателя является важным этапом определения пробиотического потенциала изучаемых штаммов. Поскольку и бактерии-антагонисты и тест-культуры обладают способностью расти на плотной пептонно-дрожжевой среде М17, антагонистические взаимоотношения определяли наиболее простым в реализации и экономичным методом перпендикулярных штрихов, в результате чего способность ингибировать рост тест-бактерий зарегистрирована только у одного из 50 исследованных штаммов молочнокислых бактерий.

Подобный результат нельзя было считать объективным, поскольку известно, что большинство молочнокислых бактерий, колонизирующих ЖКТ животных, характеризуются антагонистической активностью [7]. Следовало предположить, что использованный метод оказался мало-пригодным для решения поставленной задачи. Возможной причиной являлось то, что санитарно-показательные бактерии растут быстрее, чем происходит накопление и диффузия в плотной среде молочной кислоты и бактериоцинов.

Поэтому на следующем этапе для выявления антагонистических свойств молочнокислых бактерий использовали модифицированный метод лунок, в котором суспензии клеток предполагаемых антагонистов культивировали в жидкой среде М17 не 24, а 72 ч для накопления в культуральной жидкости антагонистических факторов. Однако и этот метод не позволил обнаружить в исследуемой выборке дополнительного числа бактерий-антагонистов. Возможной причиной могло служить то, что молочная кислота в недостаточной мере проявляет антибактериальное действие по отношению к тест-бактериям, а бактериоцины, имея белковую природу, плохо диффундируют в плотной среде.

Для облегчения диффузии веществ с антагонистическими свойствами используют полужидкую среду в методе отсроченного антагонизма. Реализация этого метода позволила обнаружить 6 штаммов бактерий-антагонистов среди 50 исследованных.

На рис. 1 приведено фото одной из чашек Петри с «пятном» бактерий штамма ММ42 28.3, вокруг которого заметна зона ингибирования роста тест-культуры в слое полужидкой среды М 17.

Несмотря на то что метод отсроченного антагонизма обеспечил выявление дополнительного числа антагонистов среди исследованных штаммов молочнокислых бактерий, представлялось, что их реальное число гораздо больше. Основываясь на приведенном предположении, мы разработали метод, сочетающий лучшие свойства использованных приемов обнаружения антагонистов: применение полужидкой среды с газоном тест-бактерий, обеспечивающей хорошую диффузию антагонистических факторов, а также культивирование антагонистов в жидкой среде М17, в которой антагонистические факторы распределяются равномерно. Чтобы разделить между собой клетки

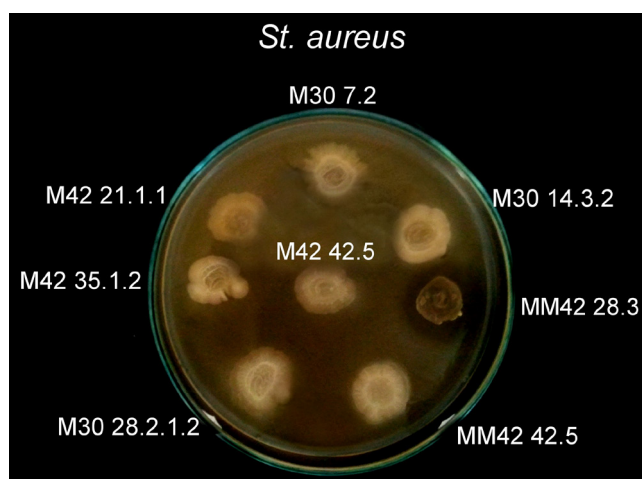


Рис. 1. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий штамма MM 42 28.3 по отношению к тест-бактериям *St. aureus* в методе отсроченного антагонизма

тест-бактерий и антагонистов и таким образом увеличить возможность визуализации зон задержки роста, использовали мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм, пропускающие питательные вещества и факторы антагонизма, но задерживающие бактериальные клетки. На рис. 2 приведено фото мембранного фильтра на газоне тест-бактерий с нанесенными на него аликвотами культуральной жидкости молочнокислых бактерий, а также полученный результат.

Схема разработанного метода представлена на рис. 3.

Применение разработанного метода позволило обнаружить антагонистические свойства у 31 из 50 (62 %) штаммов молочнокислых бактерий.

В последующем для совершенствования разработанного метода вместо среды М17 молочнокислые бактерии культивировали в обезжиренном восстановленном молоке, которое является естественной для молочнокислых бактерий средой обитания и, в отличие от среды М17, не обладает буферной емкостью, что должно способствовать снижению значений рН культуральной жидкости. В результате дополнительно выявлено 10 штаммов-антагонистов по отношению к *S. typhimurium* и *St. aureus*.

Таким образом, усовершенствованный метод позволил выявить 41 штамм молочнокислых бактерий, обладающих антагонистической активностью по отношению к санитарно-показательным бактериям, что составляет 82 % от общего количества проанализированных штаммов.

Для подтверждения того что зоны ингибирования роста санитарно-показательных тест-бактерий сформированы под действием антагонистических факторов молочнокислых бактерий,

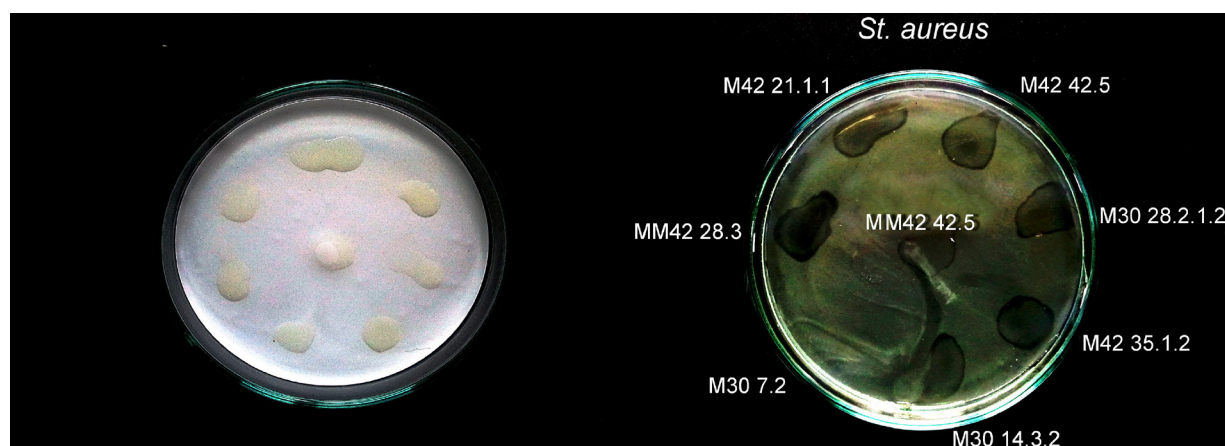


Рис. 2. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий по отношению к тест-культуре *St. aureus* в разработанном методе: слева – аликвоты культуральной жидкости антагонистов на поверхности бактериального фильтра; справа – результат определения антагонистической активности молочнокислых бактерий



Рис. 3. Схема разработанного диффузионного метода определения антагонистических свойств с использованием мембранных фильтров

использовали наиболее объективный метод определения антагонистических свойств – метод совместного культивирования. Этот метод, согласно литературным данным [3], отличается высокой результативностью, поскольку при совместном культивировании антагониста и тест-бактерий имеет место индукция синтеза факторов антагонизма под действием феромонов бактерий или пептидогликанов их клеточных стенок. В результате уровень антагонистических факторов в культуральной жидкости значительно возрастает.

Из числа молочнокислых бактерий отобрали 2 штамма, один из которых (ММ42 28.3) в методе отсроченного антагонизма обеспечивал появление зон ингибирования роста тест-бактерий, а другой (М42 42.5) – нет (рис.1). Оба выбранных штамма проявили антагонистические свойства в разработанном диффузионном методе с использованием мембранных фильтров (рис. 2).

В таблице приведены результаты выживаемости тест-бактерий после совместного инкубирования с выбранными антагонистами. Следует отметить, что на среде ПА способны формировать колонии только санитарно-показательные бактерии *S. typhimurium* и *St. aureus*, но не молочнокислые бактерии.

Результаты, полученные с использованием метода совместного инкубирования, подтверждают наличие антагонистической активности у обоих тестовых штаммов, что говорит о достоверности разработанного метода. Кроме того, из таблицы видно, что штамм ММ42 28.3 характеризуется более ярко выраженными антагонистическими свойствами, чем штамм М42 42.5, что, видимо, и объясняет то, что при использовании метода отсроченного антагонизма у этих бактерий антагонистические свойства не были выявлены. Очевидно, что методом отсроченного антагонизма обнаружить слабовыраженную антагонистическую активность бактерий не удается.

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий по отношению к *Staphylococcus aureus* в методе совместного инкубирования

Штамм-антагонист	Содержание жизнеспособных клеток <i>St. aureus</i> после совместного инкубирования с антагонистами в течение		Фактор редукции (FR %) <i>St. aureus</i> через	
	12 ч	24 ч	12 ч	24 ч
ММ42 28.3	$3,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^7$	2,4	1,8
М42 42.5	$7,3 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^8$	1,0	0,4
Контроль (отсутствуют бактерии штамма-антагониста)	$7,8 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^8$	–	–

У выявленных в ходе исследования штаммов-антагонистов исследовали наличие литических активностей, антибиотикорезистентность и способность к росту в присутствии фенола. Все бактерии показали чувствительность к широкому спектру антибиотиков, 28 штаммов проявили протеолитическую, а 5 – амилаолитическую активность. Эти особенности, наряду с антагонистической активностью, свидетельствуют о том, что приблизительно половина выделенных из помета цыплят штаммов молочнокислых бактерий обладает достаточно высоким пробиотическим потенциалом.

Заключение. Усовершенствованный диффузионный метод определения антагонистических свойств бактерий отличается высокой чувствительностью, обеспечивающей регистрацию даже слабовыраженной антагонистической активности. Его преимуществом перед суспензионным методом совместного культивирования является невысокая трудоемкость и отсутствие ограничений применения: в отличие от суспензионного, разработанный метод пригоден как для микроорганизмов с различающимися питательными потребностями (для которых невозможно подобрать общую питательную среду), так и для тех, чьи колонии на плотной питательной среде морфологически идентичны, что не позволяет дифференцировать тест-штаммы и штаммы-антагонисты.

Литература

1. Бондаренко В. М. // Фарматека. 2005. Т. 20, № 115. С. 46–54.
2. Егоров Н. С., Баранова И. П. // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44, № 6. С. 33–40.
3. Семёнов А. В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2009.
4. Terzaghi, B. E., Sandine W. E. // Appl. Microbiol. 1975. № 29. P. 807–813.
5. Белясова Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум. Мн., 2007.
6. Практикум по микробиологии / Под ред. А. И. Нетрусова. М., 2005.
7. Глушанова Н. А. // Бюл. сибирской медицины. 2003. № 4. С. 50–58.

E. F. CHERNYAVSKAYA, A. A. DUTKO, N. A. BELYASOVA

ADVANCED METHOD OF DETECTION BACTERIUA WITH ANTAGONISTIC PROPERTIES AMONG PROBIOTIC USEFUL STRAINS

Summary

On the basis of the carried-out researches the method of determination of antagonistic properties at pro-biotic strains is developed and improved. The developed method is characterized by high sensitivity and low labor input. It is established that the diffusive method with use of membrane disks is more sensitive than other well-known methods. Reliability of the received results is confirmed by means of a suspension method of joint cultivation of microorganisms.