

УДК 579.852.11.61

М.А. Хархота, А.И. Осадчая, Л.В. Авдеева

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

КОМПОЗИЦИОННЫЕ СООТНОШЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* И ПРЕБИОТИКОВ ДЛЯ СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

*Изучена активность различных соотношений пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140, а также лактита и лактулозы по отношению к условно-патогенным микроорганизмам (УПМ).*

Установлено, что наиболее выраженный антимикробный эффект проявляла композиция, состоящая из культур исследованных штаммов бацилл в соотношении 1:1. Добавление в среду культивирования пребиотических веществ в концентрации 15% усиливало антагонистическую активность бацилл относительно условно-патогенных микроорганизмов. Степень ингибирования их роста при добавлении в среду культивирования лактита была более высокой по сравнению с внесением лактулозы.

Ключевые слова: синбиотики, композиционный состав, лактит, лактулоза.

Для лечения и профилактики острых кишечных инфекций, а также коррекции дисбактериозов широко применяются пробиотические препараты, созданные на основе различных микроорганизмов: бифидобактерий, лактобактерий, аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*.

Однако существующий спектр препаратов-пробиотиков не позволяет полностью решить проблему коррекции микробиоты кишечника вследствие избирательной антагонистической активности пробиотических штаммов входящих в их состав, что в некоторых случаях обуславливает недостаточную эффективность пробиотиков при различных патологических состояниях. Поэтому актуальным и перспективным направлением совершенствования пробиотиков является создание комплексных био-препаратов, в том числе синбиотиков, в состав которых входят различные штаммы бактерий, взаимодополняющие друг друга по спектру антимикробной активности, а также пребиотики. Применение таких препаратов позволит ускорить процесс элиминации из макроорганизма возбудителей

© М.А. Хархота, А.И. Осадчая, Л.В. Авдеева, 2012



различных заболеваний и восстановит видовой и количественный состав микробиоты кишечника [2, 7].

При конструировании экспериментальных образцов таких препаратов необходимо, прежде всего, подобрать оптимальные композиционные соотношения пробиотических культур, а также веществ, используемых в качестве пребиотиков. Одним из критериев эффективности создаваемых композиций является сохранение или усиление высокой антагонистической активности пробиотических штаммов микроорганизмов.

Целью настоящей работы было оценить *in vitro* антагонистическую активность пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140 и пребиотиков лактита или лактулозы.

Материалы и методы

Объектами исследования были пробиотические штаммы *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, являющиеся основой препарата-пробиотика эндоспорина, созданного для лечения и профилактики дисбактериозов и различных кишечных инфекций [6]. В качестве тест-культур использовали *Staphylococcus aureus* УКМ В-4001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* УКМ Y-690, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329 из Украинской коллекции микроорганизмов.

Технология культивирования изучаемых штаммов бацилл, обеспечивающая получение их биомассы, содержащей 10^8 – 10^9 КОЕ/мл, разработана ранее и отражена в технологическом регламенте производства эндоспорина [6].

Бактерии выращивали в периодических условиях на качалке (200 об/мин) при 37 °С в колбах емкостью 750 мл с 50 мл питательной среды (г/л): глюкоза — 15,0, натрия цитрат — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, рН среды — $7,0 \pm 0,2$.

Суспензии штаммов бацилл с исходными концентрациями клеток 10^8 , 10^9 , 10^{10} КОЕ/мл (в работе названные «нагрузкой») смешивали в различных соотношениях (1:1, 1:2, 2:1), к ним добавляли лактит или лактулозу в концентрациях 5, 10, 15%, получая таким образом ряд экспериментальных образцов препарата. Для подбора наиболее оптимального состава создаваемых композиций использовали факторный план для двух независимых переменных на трех уровнях [1]. С учетом предложенной матрицы получили 9 различных композиций из пробиотических штаммов бацилл в различных концентрациях и лактита, а также 9 композиций из бацилл и лактулозы. В качестве критерия оценки эффективности композиции была использована ее антагонистическая активность.

Антагонистическую активность определяли в среде Гаузе-2 при совместном культивировании штаммов тест-культур микроорганизмов, бацилл и пребиотических веществ при 37 °С в течение 24 часов. После выращивания 0,1 мл суспензии из соответствующих разведений высевали на дифференциально-диагностические среды: Эндо для определения ко-



личества жизнеспособных клеток *Escherichia coli*, стафилококковый агар — *Staphylococcus aureus*, малахитовый агар — *Pseudomonas aeruginosa* и Сабуро-агар — *Candida albicans*. Концентрацию бактерий выражали в КОЕ/мл. Степень ингибирования роста тест-культур условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) определяли по методике и выражали в виде потерь их клеток в % [3].

Математическая обработка результатов заключалась в расчете эффектов влияния полученных синбиотических композиций на рост исследуемых тест-культур. Эффекты влияния различных композиций проводили путем определения разницы между показателями средних значений генеральной совокупности и средних отдельных выборок. К генеральной совокупности относили все варианты композиций, содержащие определенный фактор, к отдельным выборкам — варианты композиций, содержащие определенный фактор на отдельном уровне [1].

Эксперименты проводили в трех повторностях, в качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

В предыдущих работах показана высокая биосовместимость лактата и лактулозы с пробиотическими штаммами *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140, возможность использования их в качестве пребиотиков для усиления ингибирования роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [5].

Результаты исследования по выходу биомассы клеток тест-микроорганизмов при одновременном внесении в среду различных концентраций пробиотических штаммов и пребиотических веществ приведены в табл. 1 и 2.

Установлено, что степень ингибирования тест-культур условно-патогенных микроорганизмов, в первую очередь зависела от начальной концентрации (КОЕ) штаммов пробиотиков в исследуемых композициях. Так, если при использовании в композициях начальной суспензии бацилл, равной 10^8 – 10^9 КОЕ/мл, почти не наблюдалось разницы в уровне антагонистичной активности композиций, то при концентрации клеток штаммов пробиотиков до 10^{10} КОЕ/мл, антагонистичная активность композиций была достоверно более высокой ($p < 0,05$). Так, эффективность композиций с начальной концентрацией клеток бацилл 10^8 – 10^9 КОЕ/мл /мл относительно *E. coli* составляла 34–39%, то при концентрации 10^{10} КОЕ/мл — 44–51%

Также, следует заметить, что эффективность синбиотических композиций значительно зависит от концентрации пребиотических веществ. Наиболее активными были композиции с 15% содержанием лактата или лактулозы. Антагонистичная активность этих композиций была на 4–8% выше, чем в композициях, которые содержали другое количество пребиотических веществ.



Таблица 1

Антагонистическая активность экспериментальных симбиотических композиций с концентрацией клеток пробиотических штаммов 10^8 КОЕ/мл

Table 1

Antagonistic activity of experimental symbiotic compositions with concentration of probiotic cells 10^8 CFU/ml

Вариант композиции	X1	X2	Подавление роста, %			
	<i>B. subtilis</i> УКМ – 5139 : <i>B. subtilis</i> УКМ - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	32,98	34,34	45,83	22,11
2*	1:2	5	31,91	38,38	43,75	21,05
3*	2:1	5	32,98	34,34	46,88	22,11
4*	1:1	10	35,11	38,38	47,92	23,16
5*	1:2	10	32,98	34,34	45,83	21,05
6*	2:1	10	32,98	34,34	46,88	21,05
7*	1:1	15	44,68	41,41	52,08	26,32
8*	1:2	15	32,98	33,33	45,83	21,05
9*	2:1	15	32,98	39,39	37,50	23,16
10**	1:1	5	32,26	34,34	46,39	24,47
11**	1:2	5	31,18	34,34	46,39	24,47
12**	2:1	5	32,26	34,34	46,39	24,47
13**	1:1	10	33,33	34,34	46,39	25,53
14**	1:2	10	31,18	34,34	45,36	25,53
15**	2:1	10	32,26	34,34	46,39	23,40
16**	1:1	15	34,41	35,35	47,42	25,53
17**	1:2	15	32,26	34,34	46,39	25,53
18**	2:1	15	33,33	34,34	46,39	22,34

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.

Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



Таким образом, показано, что чем выше исходное содержание клеток пробиотических штаммов бацилл в суспензии при совместном глубинном культивировании композиции, тем более выражено их антагонистическое влияние на рост тест-культур. Причем лактит усиливал этот эффект больше, чем лактулоза.

Таблица 2

Антагонистическая активность экспериментальных синбиотических композиций с концентрацией клеток пробиотических штаммов 10^{10} КОЕ/мл

Table 2

Antagonistic activity of experimental symbiotic compositions with concentration of probiotic cells 10^{10} CFU/ml

Вариант композиции	X1	X2	Подавление роста, %			
	<i>B. subtilis</i> УKM – 5139 : <i>B. subtilis</i> УKM - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	43,62	44,44	56,25	32,63
2*	1:2	5	42,55	48,48	54,17	31,58
3*	2:1	5	32,98	44,44	57,29	32,63
4*	1:1	10	45,74	49,49	58,33	33,68
5*	1:2	10	43,62	44,44	56,25	42,11
6*	2:1	10	43,62	44,44	57,29	31,58
7*	1:1	15	55,32	51,52	62,50	36,84
8*	1:2	15	43,62	44,44	56,25	31,58
9*	2:1	15	43,62	49,49	47,92	33,68
10**	1:1	5	39,42	44,34	56,39	35,26
11**	1:2	5	38,46	39,34	56,39	35,26
12**	2:1	5	39,42	41,34	56,39	35,26
13**	1:1	10	40,38	42,34	56,39	36,32
14**	1:2	10	38,46	40,34	55,36	36,32
15**	2:1	10	39,42	44,34	56,39	34,21
16**	1:1	15	42,31	49,35	57,42	37,32
17**	1:2	15	38,46	44,34	56,39	36,32
18**	2:1	15	40,38	44,34	56,39	33,16

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.
Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



Полученные результаты подкреплялись математическими расчетами эффектов влияния различных синбиотических композиций (табл. 3).

Так, для композиций, созданных на основе штаммов пробиотиков *B. subtilis*, взятых в соотношении 1:1 с начальным количеством клеток штаммов пробиотиков 10^{10} КОЕ/мл и 15% содержанием пребиотиков, получены наибольшие по абсолютной величине и со знаком «+» значения эффектов влияния.

Таблица 3

Эффекты влияния различных композиций на тест-культуры, рассчитанные математическим путем

Table 3

Influence of the experimental compositions of sinbiotics on the growth of conditional pathogenic microorganisms, calculated mathematically

Вариант композиции	X1	X2	Эффекты влияния			
	<i>B. subtilis</i> УКМ – 5139 : <i>B. subtilis</i> УКМ - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	-0,24	-2,36	0,00	-1,40
2*	1:2	5	-0,24	-2,36	0,00	-2,46
3*	2:1	5	1,89	2,69	2,08	-0,35
4*	1:1	10	-0,24	-2,36	0,00	8,07
5*	1:2	10	-1,30	1,68	-2,08	-2,46
6*	2:1	10	11,47	4,71	6,25	2,81
7*	1:1	15	-0,24	2,69	-8,33	-0,35
8*	1:2	15	-0,24	-2,36	1,04	-2,46
9*	2:1	15	-10,87	-2,36	1,04	-1,40
10**	1:1	5	-0,21	-0,11	0,00	0,16
11**	1:2	5	-1,18	-0,11	0,00	0,22
12**	2:1	5	0,75	-0,11	0,00	0,63
13**	1:1	10	-1,18	-0,11	-1,03	0,32
14**	1:2	10	-1,18	-0,11	0,00	0,16
15**	2:1	10	2,67	0,90	1,03	1,21
16**	1:1	15	0,75	-0,11	0,00	-1,95
17**	1:2	15	-0,21	-0,11	0,00	-0,89
18**	2:1	15	-0,21	-0,11	0,00	0,16

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.
Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



В композициях с использованием других соотношений штаммов бацилл и других концентраций пребиотиков значения эффектов были получены со знаком «—» или более низкие по абсолютной величине.

Таким образом, для создания композиций из штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, обладающих наибольшей антагонистической активностью, наиболее эффективным является композиция с одинаковым содержанием клеток каждого штамма. Полученные данные подтвердили целесообразность использования такого сочетания этих штаммов при создании синбиотической композиции на их основе [4, 6].

В предыдущих работах была также показана зависимость степени влияния пребиотиков от их концентрации. Добавление в питательную среду лактата или лактулозы в концентрации 15–20% стимулировало рост пробиотических штаммов бацилл и ингибировало рост условно-патогенных микроорганизмов [5].

Результаты изучения влияния концентрации пребиотических веществ в составе экспериментальных композиций на антагонистическую активность входящих в их состав пробиотических штаммов относительно условно патогенных микроорганизмов подтвердили вышесказанное. Как лактит, так и лактулоза в концентрации 15% показали наиболее высокий эффект угнетения роста тест-культур. На это также указывают рассчитанные при математической обработке эффекты влияния. Они получились со знаком «+» и отличались по абсолютной величине от таковых композиций с концентрациями пребиотиков 5 и 10% (табл. 3).

Следовательно, наиболее высокая антагонистическая активность штаммов пребиотиков *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140 по отношению к условно-патогенным микроорганизмам может быть получена при равном соотношении их клеток (1:1). Такую композицию можно рассматривать как вариант технологии для создания комплексного синбиотического препарата на основе исследуемых штаммов бактерий рода *Bacillus*. Включение в состав синбиотика таких пребиотических веществ как лактит или лактулоза в концентрации 15% будет способствовать усилению их антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах. Изд.-во Зинатне, Рига. 1969. — 79 с.
2. Бондаренко В.М., Грачева В.М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. — 2003. — № 7. — С. 1–2.



3. Пульхеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по дисциплине «пробиотики». Ульяновск. — 2010. — 70 с.

4. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М. Пребиотик лактит как компонент биопрепарата из аэробных бацилл // Микробиологический журнал. 2008. — Т. 70, № 6. — С. 34–41.

5. Хархота М.А., Осадча А.И., Авдеева Л.В. Пребиотические свойства лактита и лактулозы // Микробиологический журнал. — 2011. — № 6. — С. 32–36.

6. Пат. 14569 Україна. Біопрепарат «ендоспорин» для лікування та профілактики ендометритів у тварин. // В.В. Смірнов, В.О. Кудрявцев, А.І. Осадча, Г.М. Калиновський. — Опубл. 20. 01.1997 р.

7. Bengmark S. Coloni food: pre- and probiotics // Amer. J. Gastroenterol. — 2000. — 95, № 1, — suppl. — P. 55–57.

Стаття надійшла до редакції 06.09.2011 р.

UDC 579.852.11.61

М.А. Kharkhota, A.I. Osadcha, L.V. Avdeeva

Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotnogo Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

COMPOSITION INTERRELATIONS OF PROBIOTIC STRAINS *B. SUBTILIS* AND PREBIOTICS FOR THE SINBIOTIC DRUG

Summary

Activity of various compositions of probiotic strains *B. subtilis* УКМ-5139 and *B. subtilis* УКМ-5140, and also lactitol and lactulosa in relation to conditionally pathogenic microorganisms is studied.

It is established that the most expressed antimicrobial effect was shown by the composition consisting the cultures of the investigated strains of bacilli in the ratio 1:1. The addition of prebiotics substances to cultivation medium in concentration of 15% strengthened antagonistic activity of bacilli of conditionally pathogenic microorganisms. The level of inhibition of their growth in addition to cultivation medium of lactitol was higher in comparison with addition of lactuloses.

Key words: synbiotics, structure of composition, lactitol, lactulosa.



УДК 579.852.11.61

М.А. Хархота, А.І. Осадча, Л.В. Авдеева

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

КОМПОЗИЦІЙНІ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *B. SUBTILIS* ТА ПРЕБІОТИКІВ ДЛЯ СИНБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ

Реферат

Вивчена активність різних співвідношень пробіотичних штамів *B. subtilis* УКМ-5139 і *B. subtilis* УКМ-5140, а також лактиту і лактулози по відношенню до умовно патогенних мікроорганізмів.

Встановлено, що найбільш виражений антимікробний ефект проявляла композиція, яка складалася з культур досліджуваних штамів бацил в співвідношенні 1:1. Додавання в середовище культивування пребіотичних речовин в концентрації 15% посилювало антагоністичну активність бацил відносно умовно патогенних мікроорганізмів. Ступінь інгібування їх росту при додаванні у середовище культивування лактиту була вищою в порівнянні з внесенням лактулози.

Ключові слова: синбіотики, композиційний склад, лактит, лактулоза.

