

УДК 579.264

## Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии

О.В. Бухарин, А.В. Семенов, С.В. Черкасов

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

**Цель.** Охарактеризовать антагонистическую активность поликомпонентных пробиотиков как результат взаимодействия входящих в них микроорганизмов и разработать критерии отбора бактерий для составления комплексных биопрепаратов.

**Материал и методы.** Тестировали на бактерицидность в отношении *Staphylococcus aureus* культуральную жидкость парных ассоциаций штаммов-пробиотиков *Bifidobacterium longum* и *Enterococcus faecium* («Бифиформ»), *Escherichia coli* М-17 («Колибактерин»), *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 («Лактобактерин») и по отдельности культуральную жидкость каждого штамма, обработанного метаболитами и пептидогликаном бактерии-ассоцианта.

**Результаты.** На примере «Бифиформа» изучен механизм действия поликомпонентных пробиотиков, заключающийся в повышении антагонистической активности одного вида микроорганизма клеточными компонентами другого, в частности метаболиты *E. faecium* обладали способностью стимулировать антагонизм *B. longum*.

По аналогии с «Бифиформом» были изучены другие сочетания пробиотиков. Обнаружено, что антагонизм ассоциации из *E. faecium* с *E. coli* М-17 обусловлен антагонистической активностью обоих штаммов, стимулируемых метаболитами друг друга. При изучении взаимодействия в остальных бактериальных ассоциациях достоверных стимулирующих эффектов не наблюдали.

**Выводы.** Выявленные эффекты позволяют рассматривать антагонистическую активность бактерий как результат взаимодействия между микроорганизмами, когда активный штамм выполняет роль продуцента антимикробных веществ, а ассоциативные бактерии определяют возможность и выраженность проявления антагонизма. Предложены критерии отбора пробиотических штаммов и модель для создания поликомпонентных пробиотиков, включающая штамм-антагонист и штамм-стимулятор его ростовых и/или антагонистических свойств.

**Ключевые слова:** пробиотики, антагонизм, межмикробные отношения, пептидогликан.

### Antagonistic Activity of Probiotic Bacteria

O.V. Bukharin, A.V. Semenov, S.V. Tcherkasov

Institute of cellular and intracellular symbiosis, Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

**Objective:** To investigate antagonistic activity of multi-component probiotic products resulting from interactions

of microorganisms; to develop bacterial selection criteria for multi-component biological products.

**Materials and Methods:** Culture fluid of the paired probiotic strain associations: *Bifidobacterium longum* with *Enterococcus faecium* («Biform» product), *Escherichia coli* М-17 («Colibacterin» product) and *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 («Lactobacterin» product) were tested

Контактный адрес:  
Александр Васильевич Семенов  
Тел./факс: (3532) 774463  
Эл. почта: kever3@yandex.ru

for bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. Also, culture fluid of the each strain was treated with metabolites and peptidoglycan of the associative species and then tested for bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*.

**Results:** Using the «Bifiform» product as an example, mechanism of action of multi-component probiotic products was studied. This included an increase in antagonistic activity of one species through the interaction with the cellular components of another species. In particular, metabolites of *E. faecium* were shown to be able to enhance antagonistic activity of *B. longum*. Similarly to «Bifiform» product, other probiotic strain associations were studied. Antagonism of *E. faecium* in association with *E. coli* M-17 was found to be determined by mutually

## Введение

Для поддержания колонизационной резистентности биотопа используют препараты на основе живых бактерий и их метаболитов, значительное место среди которых занимают поликомпонентные пробиотики [1]. Целью их применения является создание стабильного микробиоценоза, представляющего бактериальную ассоциацию микроорганизмов различных видов. Одним из современных направлений в медицинской микробиологии, объясняющих сложные взаимодействия в бактериальных ассоциациях, является концепция ассоциативного симбиоза, согласно которой симбиоз хозяина и микроорганизмов – многокомпонентная система, в которой, кроме хозяина и доминантных микросимбионтов, участвуют ассоциативные симбионты, выполняющие значительную роль в формировании и обеспечении стабильности и продуктивности симбиоза в целом [2].

Одним из механизмов реализации роли бактерий-ассоциантов может явиться их способность регулировать функции нормальной микрофлоры. К настоящему времени известны данные о взаимодействии микроорганизмов в ассоциациях, приводящие к стимуляции ростовых и антагонистических свойств бактерий [3]. Однако не исследован вклад бактерий-ассоциантов в феномен колонизационной резистентности [2], практически на разработаны способы их применения на практике. Одним из таких способов может быть подбор бактерий для поликомпонентных пробиотиков, которые с позиций ассоциативного симбиоза можно рассматривать как композицию взаимодействующих пробиотических бактерий, состоящую из доминантного антагониста и ассоцианта – стимулятора антагонизма.

Цель настоящего исследования: охарактеризовать антагонистическую активность поликомпо-

enhanced antagonistic activity of the both strains. The rest of the studied bacterial associations demonstrated no significant enhancement.

**Conclusions:** Antagonistic activity of microorganisms is a result of microbial interactions, where an active strain produces antimicrobial substances, and associative strains determine potential for and magnitude of antagonism. The probiotic strain selection criteria and a model for compiling multi-component probiotic products. This model includes one strain with antagonistic activity and another strain enhancing the growth and/or antagonistic properties of the former one.

**Key words:** probiotic, antagonism, microbial interactions, peptidoglycan.

нентного пробиотика как результат взаимодействия входящих в него микроорганизмов и разработать критерии отбора бактерий для составления комплексных биопрепаратов.

## Материал и методы

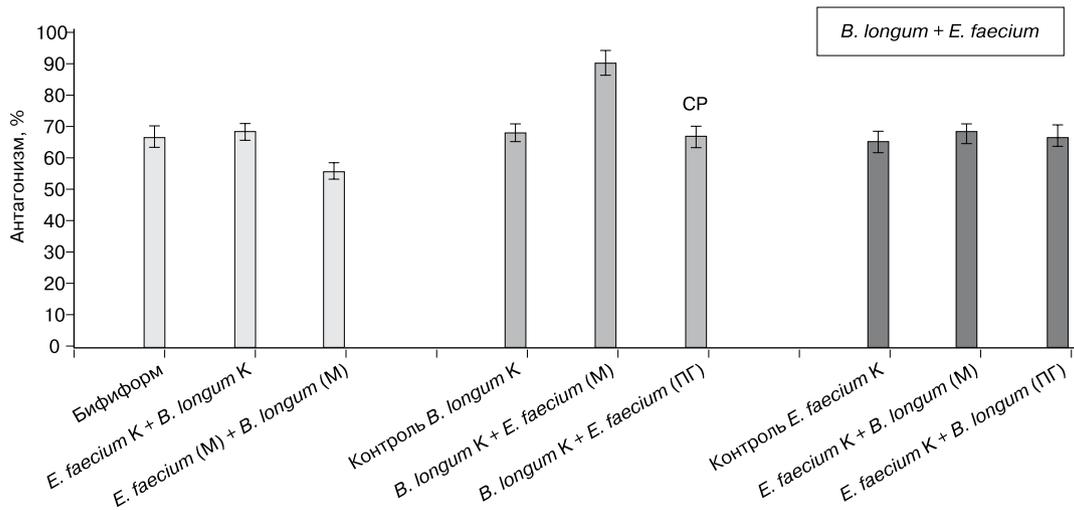
В работе использовали штаммы-пробиотики: *Escherichia coli* M-17 («Колибактерин», НПО «Микроген», Н.-Новгород), *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 («Лактобактерин», НПО «Микроген», Пермь), *Bifidobacterium longum* («Бифиформ», Ферросан А/С, Дания), *Enterococcus faecium* («Бифиформ», Ферросан А/С, Дания).

Индикаторная культура: клинический изолят, идентифицированный как *Staphylococcus aureus* на основании его тинкториальных, морфологических и биохимических характеристик по Берги, с использованием тест-систем Api ID 32 Staph, (Bio Merieux, Франция).

Культивирование бактерий проводили микроаэрофильно на среде *Манна-Рогоза-Шарпа* (МРС; HiMedia, Индия) и 1,5% пептонной воде (ПВ; НПО «Питательные среды», Махачкала) при 37 °С.

Для определения влияния бактерий-ассоциантов на антагонистическую активность (АА) доминантных бактерий использовали метод тестирования на бактерицидность культуральной жидкости исследуемой культуры, обработанной метаболитами и пептидогликанами пробиотических штаммов [4]. Пептидогликаны бактерий получали по Герхардту [5] с дополнительной обработкой микробной биомассы смесью этилового спирта и хлороформа, щелочью и ацетоном. В работе использовали количество пептидогликана бактерии-ассоцианта, равное оптической плотности бульонной культуры.

Бактериальный антагонизм выражали в процентах угнетения прироста КОЕ индикаторной культуры под действием метаболитов антагониста,



**Рис.1.** Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий *B. longum* и *E. faecium* при их взаимодействии. Культивирование в МРС-среде. Обозначения (здесь и на рис. 2 и 3): К – чистая культура, М – метаболиты, ПГ – пептидогликан. Индикаторная культура *S. aureus*.

\* –  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующим контролем антагонистической активности, СР – стимуляция роста.

по сравнению с приростом КОЕ при влиянии среды роста антагониста (бактерицидность за 1 час инкубации).

Для определения способности молочнокислых бактерий регулировать антагонизм культуральные жидкости последних нейтрализовали до pH МРС – 6,2. Совокупное действие метаболитов штаммов из одной композиции изучали путем измерения бактерицидности их культуральных жидкостей по отдельности и в смеси 1:1. Аналогичным образом изучали возможное усиление антимикробного действия метаболитов антагониста метаболитами бактерии-ассоцианта, но последние разбавляли соответствующей средой культивирования до концентрации в опытных пробах.

Все эксперименты проводили в двух сериях при двукратном воспроизведении. Результаты обрабатывали с использованием критерия Фишера–Стьюдента.

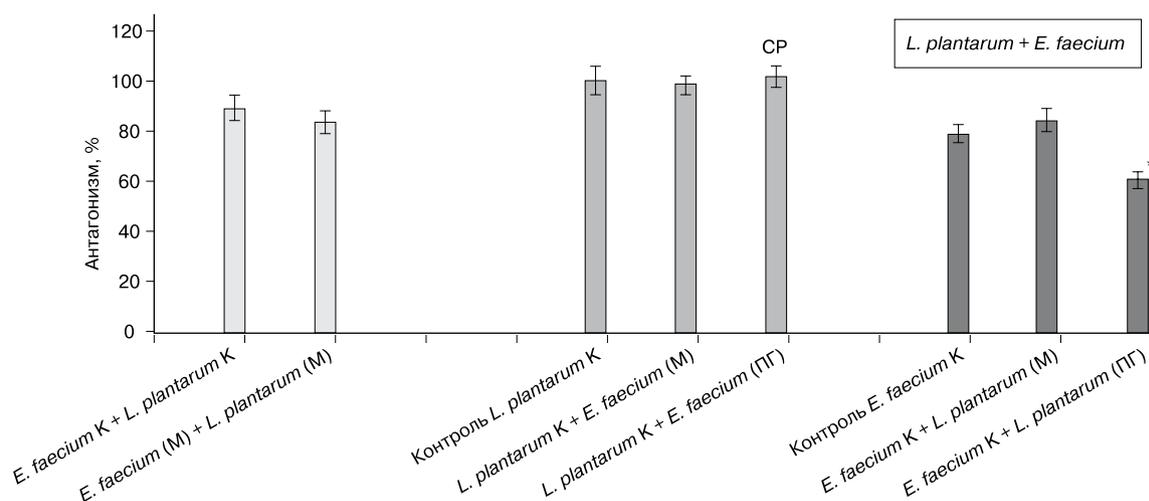
### Результаты исследования

При изучении влияния одного компонента композиции из пробиотиков на ростовые и антагонистические свойства другого компонента было обнаружено, что рост и активность антагонистов регулируются клеточными компонентами изученных микроорганизмов. Изменение АА не было связано с совокупным действием антимикробных веществ бактерии-ассоцианта и исследуемой культуры антагониста. В ряде случаев выявлялась связь между стимуляцией АА и повышением ростовых характеристик антагониста.

При исследовании «Бифиформа» (композиция из *B. longum* и *E. faecium*) выявлено, что уровень бактерицидности препарата, при его росте в МРС-среде, соответствовал уровню активности смешанной культуры *E. faecium* с *B. longum* – соответственно  $67 \pm 2$  и  $68 \pm 1\%$ , что указывает на активность препарата, связанную только с бактериальным компонентом. Количество КОЕ при росте бактерий в чистой смеси и в составе «Бифиформа», т.е. вместе с небактерийными компонентами препарата, в обоих случаях было одинаковым и составило  $9 \pm 0,5$  lg КОЕ/мл для энтерококка и  $8 \pm 0,4$  lg КОЕ/мл для бифидобактерии. Активность смеси метаболитов –  $56 \pm 4\%$  для варианта *E. faecium* (M) + *B. longum* (M) (рис. 1).

При оценке влияния бактерий друг на друга наблюдали АА монокультуры *B. longum* на уровне активности смешанной культуры, составившей  $68 \pm 1\%$  (при количестве бифидобактерий  $11 \pm 0,2$  lg КОЕ/мл). После обработки штамма-антагониста метаболитами *E. faecium* бактерицидная активность *B. longum* значительно возростала и составила  $90 \pm 2\%$  (при количестве бифидобактерий  $10,9 \pm 0,4$  lg КОЕ/мл); при действии пептидогликана энтерококка –  $67 \pm 1\%$  (при количестве бифидобактерий  $12 \pm 0,1$  lg КОЕ/мл). *B. longum* обладала индифферентным действием в отношении АА *E. faecium*.

Эффекты стимуляции антагонизма, обнаруженные при изучении взаимодействия пробиотических бактерий, можно считать одним из механизмов действия поликомпонентных пробиотиков, в частности эффективность «Бифиформа» может быть



**Рис. 2.** Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 и *E. faecium* при их взаимодействии. Культивирование в МРС-среде.

связана с антагонизмом *B. longum*, стимулируемым *E. faecium*. К сожалению, при совместном культивировании в МРС данных бактерий способность энтерококка не проявлялась, вероятно, из-за его АА к бифидобактериям.

По аналогии с «Бифиформом» были изучены другие сочетания пробиотиков.

При исследовании композиции из *L. plantarum* 8PA-3 и *E. faecium* обнаружено, что при их росте в МРС-среде уровень АА смеси бактерий составил  $87 \pm 1\%$  (рис. 2) при количестве энтерококка –  $9,7 \pm 0,3$  lg КОЕ/мл, лактобацилл –  $7,7 \pm 0,6$  lg КОЕ/мл. Активность смеси метаболитов составляла  $82 \pm 2\%$ . При раздельном культивировании было определено, что активность монокультуры *E. faecium* в контроле составила  $77 \pm 2\%$  (при количестве энтерококка  $9,6 \pm 1$  lg КОЕ/мл), метаболиты лактобацилл незначительно усиливали проявление признака до  $82 \pm 2\%$  ( $p > 0,05$ ), а их пептидогликан ингибировал антагонизм до  $59 \pm 3\%$  ( $p < 0,05$ ).

Бактерицидная активность монокультуры *L. plantarum* 8PA-3 в контроле составила  $98 \pm 0,1\%$  (при количестве лактобацилл  $11,6 \pm 0,2$  lg КОЕ/мл), что значительно выше активности смешанной культуры. Метаболиты энтерококка задерживали рост *L. plantarum*, антагонизм не усиливали, в то время как пептидогликаны стимулировали рост *L. plantarum* 8PA-3 с  $11,6 \pm 0,2$  до  $12,4 \pm 0,1$  lg КОЕ/мл, но достоверного повышения бактерицидности не наблюдалось. Антагонистические отношения между пробиотиками, наличие ингибирующей антагонизм активности и слабовыраженная способность изученных бактерий стимулировать антагонистические свойства друг друга не позволили повысить АА смешанной культуры *L. plantarum*

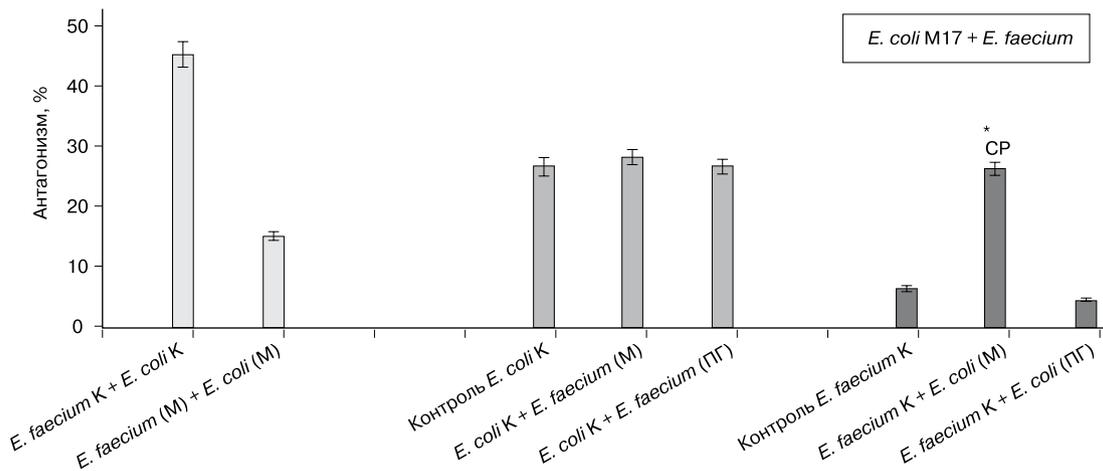
8PA-3 с *E. faecium*, по сравнению с их монокультурами.

При исследовании композиции из *E. coli* М-17 с *E. faecium* определено, что при их росте в пептонной воде уровень бактерицидности смеси бактерий составил  $45 \pm 5\%$  (рис. 3) при количестве энтерококка –  $9,7 \pm 1$  lg КОЕ/мл, кишечной палочки –  $9,5 \pm 0,5$  lg КОЕ/мл. Активность смеси метаболитов составляла  $15 \pm 2\%$ . При раздельном культивировании было выявлено, что клеточные компоненты энтерококка оказывали индифферентное действие на антагонизм *E. coli* М-17, но метаболиты выражено стимулировали рост кишечной палочки – с  $8 \pm 0,1$  lg КОЕ/мл в контроле до  $8,5 \pm 0,05$  lg КОЕ/мл в опыте ( $p < 0,05$ ). В свою очередь, метаболиты *E. coli* М-17 стимулировали ростовые и антагонистические свойства *E. faecium*, повышая АА с  $6 \pm 1\%$  в контроле ( $6,5 \pm 0,5$  lg КОЕ/мл), до  $26 \pm 6\%$  в опыте ( $8,4 \pm 0,2$  lg КОЕ/мл). Взаимное стимулирование роста и/или антагонизма изученных бактерий нашло отражение в увеличении биомассы и антагонистической активности всей композиции, по сравнению с монопрепаратами.

Однако в комбинациях *L. plantarum* 8PA-3 с *B. longum*, *L. plantarum* 8PA с *E. coli* М-17 и *B. longum* с *E. coli* М-17, при их росте в МРС-среде, достоверных стимулирующих рост и антагонизм эффектов не обнаружено.

### Обсуждение результатов

В результате проведенных исследований установлено взаимодействие пробиотических бактерий в ассоциациях, которое выражалось в изменении их антагонизма и ростовых характеристик. Механизмы микробной регуляции АА бактерий могут быть раз-



**Рис. 3.** Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 и *E. faecium* при их взаимодействии. Культивирование в пептонной воде.

нообразными и в каждом случае требуют специального рассмотрения.

К усилению антагонистических свойств культуры могут приводить как условия улучшения её метаболических и ростовых характеристик [6, 7], так и действие специфических индукторов [8–12].

Очевидно, что возрастание АА на фоне стимуляции роста не всегда является следствием увеличения продукции антимикробных веществ бактериальными клетками, а может происходить за счет увеличения общей биомассы культуры антагониста. В случае *E. faecium*, обработанного метаболитами *E. coli*, увеличение роста сопровождалось усилением АА в пересчёте на одну КОЕ культуры, т.е. происходила как стимуляция роста популяции, так и увеличение продукции антагонистического фактора.

Помимо стимуляции АА, наблюдали и её ингибирование. Это может быть связано с инактивацией бактерией-ассоциантом антимикробных факторов [13] или с отрицательным влиянием на метаболизм антагониста бактерии-ассоцианта, например за счет её антимикробных веществ. Так, при изучении композиций *B. longum* с *E. faecium* и *L. plantarum* с *E. faecium* наблюдали, что из-за антагонистических отношений общая активность смеси бактерий не превышала активность отдельных микроорганизмов, несмотря на потенциальные возможности к стимулированию ростовых и антимикробных характеристик антагониста.

В случае комбинации *E. coli* с *E. faecium* эффект стимуляции проявлялся как при раздельном, так и при совместном культивировании бактерий, в результате чего наблюдали увеличение АА композиции, по сравнению с отдельными компонентами.

Эти данные могут объяснить эффективность известного поликомпонентного пробиотика «Окарин», состоящего из ассоциации кишечной палочки с энтерококком.

Предложенные способы регуляции АА позволяют применять их на практике путем использования индивидуальных стимуляторов роста и/или антагонизма в качестве добавок к основному антагонисту в виде клеточной биомассы, детрита, что используется при создании продукта («Баланс-Наринэ», [14]). Кроме того, возможно использование бактерий-стимуляторов или их метаболитов/клеточных стенок в виде отдельных биопрепаратов.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено взаимодействие пробиотических бактерий в смешанных культурах, которое выражалось в изменении их антимикробных и ростовых свойств. Обнаруженные эффекты позволяют рассматривать композицию пробиотиков, в которой штаммы-симбионты, взаимодействуя, могут выполнять различные функции – доминантного антагониста и ассоцианта-стимулятора, моделью для создания новых пробиотиков.

Полученные результаты позволяют сформулировать следующие критерии отбора бактерий-ассоциантов в качестве доминантных антагонистов для составления из них поликомпонентных пробиотиков: отсутствие выраженной АА в отношении друг друга; способность повышать ростовые характеристики доминантного(ых) антагониста(ов); способность стимулировать АА доминантного(ых) антагониста(ов).

В итоге, на примере представителей нормальной микрофлоры показано явление микробной регуляции бактериальных свойств, которое можно отнес-

ти к одному из механизмов формирования и функционирования микросимбиоза, направленных на поддержание колонизационной резистентности биотопа, через регуляцию антагонизма автохтонных доминантов ассоциативными микроорганизмами. Выявленные эффекты позволяют рассматривать антагонистическую активность бактерий как результат взаимодействия между микроорганизмами, при котором активный штамм выполняет роль продуцента антимикробных веществ, а ассоциатив-

ные бактерии определяют возможность и выраженность проявления антагонизма.

Полученные данные по микробной регуляции свойств микроорганизмов могут быть положены в фундамент разработки нового класса пробиотиков или способов нового применения уже существующих, действие которых будет основано на способности микроорганизмов усиливать защитный потенциал определенных представителей индигенной микрофлоры индивидуума.

### Литература

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. т. 3. Пробиотики и функциональное питание. М.: «Изд-во Грант», 2001; 288 с.
2. Бухарин О.В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза. Журн микробиол 2009; 1:83-6.
3. Семенов А.В., Сгибнев А.В., Черкасов С.В., Бухарин О. В. Микробная регуляция антагонистической активности бактерий. Бюлл эксп биол мед 2007; 11:545-48.
4. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В. Способ определения способности микроорганизмов регулировать антагонистическую активность бактерий. Патент РФ №2376381 от 20.12.2009; Б.и. № 35. 2009.
5. Методы общей бактериологии; т 2. / Под ред. Ф. Герхардта и др. М.: «Мир». 1984; 472 с.
6. Вахитов Т.Я. Регуляторные функции бактериальных экзометаболитов на внутритропуляционном и межвидовых уровнях. Дисс... докт биол наук 2007.
7. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. М.: «Изд-во МГУ», «Наука». 2004; 503 с.
8. Черныш А.Ю. Влияние пептидов-индукторов на антимикробную активность энтерококков. Гастроэнтерол Санкт-Петербурга 2008; 2-3:М127.
9. Barefoot S.F. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Appl Environ Microbiol 1994; 60:3522-8.
10. Bronneke V., Fiedler F. Production of bacteriolytic enzymes by *Streptomyces globisporus* regulated by exogenous bacterial cell walls. Appl Environ Microbiol 1994; 60:785-91.
11. Kleerebezem M., Quadri L.E.N., Kuipers O.P., de Vos W.M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction system in gram-positive bacteria. Mol Microbiol 1997; 24:895-904.
12. Maldonado A., Ruiz-Barba J.L., 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; 181:8-16.
13. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. Успехи биол химии 2004; 44:263-306.
14. Хачатрян А.П., Хачатрян Н.А. Бактериальный пробиотический препарат «Баланс-Наринэ». Патент РФ №2253672 от 07.12.2002; Б.и. № 16. 2005.