

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ НАДОСАДОЧНОЙ ЖИДКОСТИ НАТИВНОЙ КУЛЬТУРЫ LACTOBACILLUS PLANTARUM 8P-A3*

Чичерин И.Ю.¹, Погорельский И.П.², Лундовских И.А.², Дармов И.В.², Малов А.А.³

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад, Россия (141306, Сергиев Посад-6 МО, ул. Октябрьская, 19-3), e-mail: rpatron@mail.ru

² ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

³ НИЦ ФБУ «33 ЦНИИИ Министерства обороны Российской Федерации», Киров, Россия (610017, Киров, Октябрьский пр., 121)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND COMPOSITION OF THE SUPERNATANT FLUID OF NATIVE CULTURE LACTOBACILLUS PLANTARUM 8P-A3

Chicherin I.Yu.¹, Pogorelsky I.P.², Lundovskikh I.A.², Darmov I.V.², Malov A.A.³

¹ Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad, Russia (Oktyabrskaya st., 19-3, Sergiev Posad-6, Russia, 141306), e-mail: rpatron@mail.ru,

² Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

³ RC FSE «Russian Federation Ministry of Defense 33 Central Research and Development Testing Institute», Kirov, Russia (Oktyabrsky pr., 121, Kirov, Russia, 610017)

РЕЗЮМЕ

Объектом изучения является надосадочная жидкость нативной культуры лактобацилл *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 коммерческого пробиотического препарата Лактобактерин, выращенной в микроаэрофильных условиях в жидкой питательной среде при температуре 37 °С. Определен состав надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл и изучена ее антибактериальная активность в опытах *in vitro* и *in vivo* на инфицированных возбудителями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза конвенциональных белых мышах.

Антибактериальная активность надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 обусловлена содержащимися в ней молочной кислотой, длинноцепочечными жирными кислотами и некоторыми другими бактериальными экзометаболитами.

Ключевые слова: пробиотик Лактобактерин, лактобациллы, экзометаболиты, антибактериальная активность, белые мыши, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно Отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [1], дисбактериоз кишечника рассматривается как клинико-лабораторный синдром, возникающий при ряде заболеваний и клинических ситуаций, характеризующийся изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися у части больных клиниче-

SUMMARY

The object of study is the supernatant fluid of native culture *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 of commercial probiotic preparation Lactobacterin grown under microaerophilic conditions in a liquid nutrient medium at a temperature of 37 °C. The composition of the supernatant fluid of lactobacilli native culture was characterized and its antibacterial activity was studied *in vitro* and *in vivo* on conventional white mice infected with pathogens of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis.

The antibacterial activity of the supernatant fluid of native culture *L. plantarum* 8P-A3 is due to lactic acid, long-chain fatty acids and some other bacterial exometabolites contained therein.

Key words: probiotic Lactobacterin, Lactobacteria, exometabolites, antibacterial activity, white mice, pseudotuberculosis, intestinal yersiniosis.

скими проявлениями. К числу заболеваний, при которых объективно выявляются выраженные дисбиотические изменения в составе нормальной кишечной микрофлоры, относятся псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз – острые зоонозные бактериальные инфекции, вызываемые близкородственными возбудителями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* [2].

Особенности клинического течения заболеваний обуславливают известные трудности выявления возбудите-

* Ссылка для цитирования: Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дармов И.В., Малов А.А. Антибактериальная активность и состав надосадочной жидкости нативной культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Журнал Международной Медицины. - 2013. - №1(2). - С.131-139.

лей, диагностики и лечения заболеваний. Летальность при септической форме псевдотуберкулеза может достигать 25-50 %, а при кишечном иерсиниозе – 30-60 % [3, 4]. При псевдотуберкулезе, как и при кишечном иерсиниозе, очень часто на фоне микробиологических нарушений в консорциуме нормальной кишечной микрофлоры возникают и прогрессируют метаболические нарушения, которые провоцируют ускоренное течение патологического процесса с быстрым летальным исходом [5].

Благодаря разработке экспериментальных моделей псевдотуберкулезной и иерсиниозной инфекций [6-8] было доказано, что при естественном (энтеральном) пути внедрения патогенных бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* важнейшим этапом инфекционного процесса является взаимодействие возбудителя со слизистой оболочкой кишечника.

Комплекс факторов патогенности возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, детерминируемых соответствующими генами хромосомной и плазмидной локализации [2, 3, 9, 10], обеспечивают определенное экологическое преимущество патогенным иерсиниям именно на начальном этапе их взаимодействия со слизистой оболочкой кишечника.

Классический путь инфицирования патогенными иерсиниями чувствительного организма животного начинается с адгезии иерсиний к отдельным эпителиоцитам в основном над куполами пейеровых бляшек в илеоцекальном отделе кишечника с последующей колонизацией поверхности эпителия. В дальнейшем происходит вытеснение (замещение) собственной кишечной микрофлоры у инфицированных животных, инвазия и размножение патогенных иерсиний в отдельных макрофагах и, наконец, образование сплошных биопленок на поверхностном эпителии и в криптах илеоцекального отдела, а также в начале ободочной кишки [2, 7].

В экспериментах на конвенциональных белых мышах нами была изучена возможность предотвращения развития псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, а также дисбиотических изменений в составе кишечной микрофлоры, при пероральном введении животным бактериальных суспензий *Y. pseudotuberculosis* 147 и *Y. enterocolitica* 1407 [11].

Было установлено, что пробиотик Стимбифид, а также надосадочная жидкость нативной культуры пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, содержащая микробные экзометаболиты, полностью предотвращали генерализацию псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза у инфицированных животных, а также развитие дисбиотических нарушений в консорциуме кишечной микрофлоры.

Протективная эффективность пробиотика Стимбифид и надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, выделенных из коммерческого препарата Лактобактерин, послужила основанием для формулировки предположения о том, что содержащиеся в нативной культуре лактобацилл микробные экзометаболиты, как и пробиотик Стимбифид, оказывают положительное влияние на колонизационную резистентность слизистой оболочки кишечника конвенциональных белых мышей, препятствуя адгезии патогенных иерсиний к соответствующим рецепторам на слизистые оболочки кишечника, а в последующем – обеспечивая ускоренную элиминацию патогенных иерсиний из кишечника.

Действительно, как свидетельствуют опубликованные данные клинко-лабораторных исследований [12-15], живые лактобациллы, входящие в состав нормальной кишечной микрофлоры, обладают широкой антагонистической активностью за счет продукции органических

кислот, микробного лизоцима, перекиси водорода и различных антибиотиков. Они также синтезируют различные ферменты и витамины, принимающие участие в процессе пищеварения, обладают иммуномодулирующим действием, важным для восстановления естественных иммунных факторов защиты организма.

В связи с вышеизложенным, представляется целесообразным продолжить исследования, связанные с изучением протективной эффективности надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 при пероральном заражении конвенциональных белых мышей бактериями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.

Цель работы состоит в изучении антибактериальной активности и состава надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* с использованием инфицированных возбудителями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза конвенциональных белых мышей.

Материалы и методы исследований

В экспериментах по моделированию псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза на конвенциональных белых мышах использовали кальцийзависимый штамм 147 *Y. pseudotuberculosis* I серотипа, содержащий плазмиду с молекулярной массой 47 МДа, а также кальцийнезависимый штамм 1407 *Yersinia enterocolitica* серотипа 0:9, содержащий плазмиду с молекулярной массой 42 МДа.

Оба штамма выделены от больных с манифестными проявлениями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Определенные в экспериментах на конвенциональных белых мышах значения среднесмертельных доз (LD_{50}) при пероральном введении суспензий бактерий составляют: для штамма *Y. pseudotuberculosis* 147 – $8,5 \cdot 10^4$ КОЕ, для штамма *Y. enterocolitica* – $7,4 \cdot 10^7$ КОЕ.

Бактерии штамма лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 были выделены из лиофилизированного пробиотического коммерческого препарата Лактобактерин (серия 15/6, производство ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Выращивание лактобацилл и бифидобактерий, выделенных из фекалий подопытных животных, проводили на плотной питательной среде рекомендованного состава [16, 17], эшерихий – на среде Эндо. Иерсинии псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза выращивали на агаре Хоттингера.

Для выращивания представителей нормальной микрофлоры фекалий конвенциональных белых мышей при температуре 37 °C использовали систему для анаэробного культивирования (анаэроустат) Anaerobic system Mark III-LE003 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Выращивание иерсиний псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза с учетом их психрофильности [2, 3] проводили на агаре Хоттингера при пониженной температуре (8 °C и 24 °C соответственно).

Для получения нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 использовали жидкую питательную среду, содержащую пептон, дрожжевой экстракт, витамины (B1, B5), глюкозу, стимуляторы роста (гемин и сульфит натрия), соль (хлорид натрия), твин-80. Выращивание лактобацилл в жидкой питательной среде проводили при температуре 37 °C в системе для анаэробного культивирования в течение 72 часов.

Общее количество микробных клеток в пересчете на 1 г фекалий подопытных животных определяли подсчетом в камере Горяева (модель 851, ЛПО «Красногвардеец», Россия). Количество живых микроорганизмов (КОЕ) в суспензиях определяли высевом соответствующих десятикратных серийных разведений исследуемых суспензий

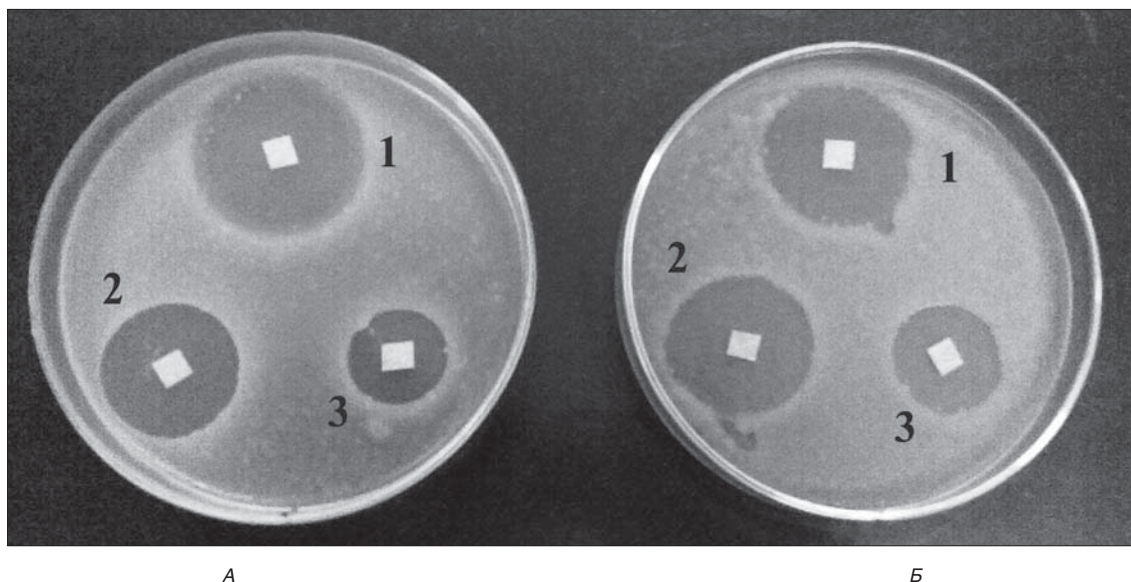


Рисунок 1 – Зоны ингибирования микробного роста штамма *Y. pseudotuberculosis* 147 (А) и *Y. enterocolitica* 1407 (Б): 1 – гентамицин; 2 – надосадочная жидкость, полученная центрифугированием нативной культуры лактобацилл; 3 – надосадочная жидкость, полученная после естественной седиментации лактобацилл.

на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний по истечении времени инкубирования.

Надосадочную жидкость для исследования получали путем центрифугирования нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 при 3000 г в течение 15 мин.

Антибактериальную активность надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 определяли по методу J.H. Jorgensen и J.D. Turnide [18].

Компонентный состав надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 (в том числе жирнокислотный состав) определяли методом газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием с использованием капиллярных колонок CB-WAX58 и Equity™-5 30,0 м x 0,32 мм x 0,32 мкм на приборе Shimadzu-QP2010 Plus. Экстракцию компонентов надосадочной жидкости проводили с использованием ацетонитрила.

В экспериментах использовали конвенциональных белых мышей обоего пола массой 18-20 г.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [19].

Результаты исследования

Нативную культуру лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 получали, выращивая выделенные из коммерческого пробиотического препарата Лактобактерин бактерии в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С в жидкой питательной среде в течение 72 часов. Концентрация лактобацилл по окончании культивирования составила $3,2 \cdot 10^9$ КОЕ • мл⁻¹.

Надосадочную жидкость получали центрифугированием нативной культуры лактобацилл и путем самопроизвольного осаждения нативной культуры в статических условиях при температуре 5 °С. В обоих случаях надосадочная жидкость имела одинаковое значение pH, равное 5,4.

Опыты *in vitro*, в которых определялись зоны задержки роста бактерий *Y. pseudotuberculosis* 147 и *Y. enterocolitica* 1407 (рисунок 1) под влиянием надосадочной жидкости лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, свидетельствуют о том, что вокруг тест-объектов, пропитанных раствором ген-

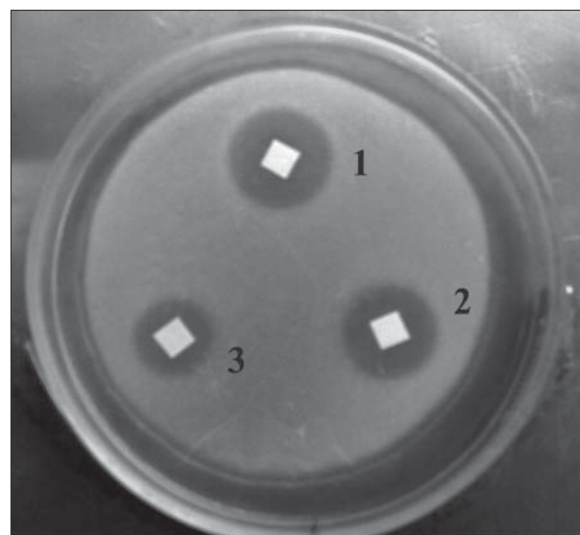


Рисунок 2 – Зоны ингибирования микробного роста *L. plantarum* 8P-A3: 1 – гентамицин; 2 – надосадочная жидкость, полученная центрифугированием нативной культуры лактобацилл; 3 – надосадочная жидкость, полученная после естественной седиментации лактобацилл.

тамицина (продукция ОАО «Биохимик», Россия) в концентрации 1 мкг • мл⁻¹ и надосадочной жидкостью, полученной после центрифугирования нативной культуры лактобацилл, формируются выраженные зоны ингибирования роста иерсиний псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, имеющие практически одинаковый диаметр.

Вокруг тест-объекта, пропитанного надосадочной жидкостью, полученной в процессе естественной седиментации, диаметр зон задержки роста иерсиний существенно меньше, что, по-видимому, связано с пониженной диффузией надосадочной жидкости в агаре вследствие присутствия определенного количества лактобацилл во взвешенном состоянии, препятствующих процессу диффузии.

На рисунке 2 представлены результаты определения зон задержки роста бактерий *L. plantarum* 8P-A3 под влиянием надосадочной жидкости, полученной после осаждения лактобацилл нативной культуры того же штамма.

Из рисунка 2 следует, что надосадочная жидкость, полученная центрифугированием (и в меньшей степени седиментацией) нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, ингибирует рост лактобацилл того же штамма, клетки которого не обладают иммунитетом против своих же экзометаболитов, образующихся в процессе роста в жидкой питательной среде.

С учетом полученных результатов *in vitro*, были поставлены эксперименты *in vivo* по оценке протективной активности полученной центрифугированием нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 надосадочной жидкости при пероральном заражении конвенциональных белых мышей суспензиями иерсиний псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Животных 1 и 4 контрольных групп инфицировали перорально бактериями *Y. pseudotuberculosis* 147 и *Y. enterocolitica* 1407 соответственно в дозе, равной 10 LD₅₀.

Животных 2 и 5 групп после инфицирования лечили внутримышечным введением гентамицина по 1 мг в сутки в течение 6 дней, начиная со вторых суток после перорального введения суспензий бактерий псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза.

Животные третьей и шестой групп являлись опытными. Им вводили за 5 дней до инфицирования суспензиями бактерий псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза по 0,2 мл перорально надосадочную жидкость нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, а также в течение 6 дней после инфицирования.

В начале экспериментов и на 25 сутки (или в день гибели) в фекалиях животных определяли общее количество

микроорганизмов кишечной микрофлоры, отдельных ее представителей, а также содержание патогенных иерсиний. Результаты определений представлены в таблице.

Из представленных данных видно, что животные 1 и 4 контрольных групп в результате перорального инфицирования возбудителями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза погибли в сроки, характерные для этих инфекций. Выделенные чистые культуры иерсиний от погибших животных свидетельствуют о развитии генерализованной инфекции. При этом на селективной плотной питательной среде из фекалий обеих групп животных были выделены культуры иерсиний псевдотуберкулеза ($6,8 \cdot 10^7$ КОЕ \cdot г⁻¹) и бактерий кишечного иерсиниоза ($5,8 \cdot 10^5$ КОЕ \cdot г⁻¹). Данные бактериологического исследования фекалий животных обеих контрольных групп свидетельствуют о глубоких дисбиотических изменениях в составе кишечной микрофлоры, соответствующих 3 степени нарушения по классификации И.К. Максимова [20].

Лечение гентамицином инфицированных животных 2 и 5 групп, начатое через 24 часа после перорального введения суспензий патогенных иерсиний, полностью прервало развитие псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, хотя избежать дисбиотических изменений в составе кишечной микрофлоры не удалось: дисбиотические нарушения соответствуют 2 степени по классификации И.К. Максимова [20].

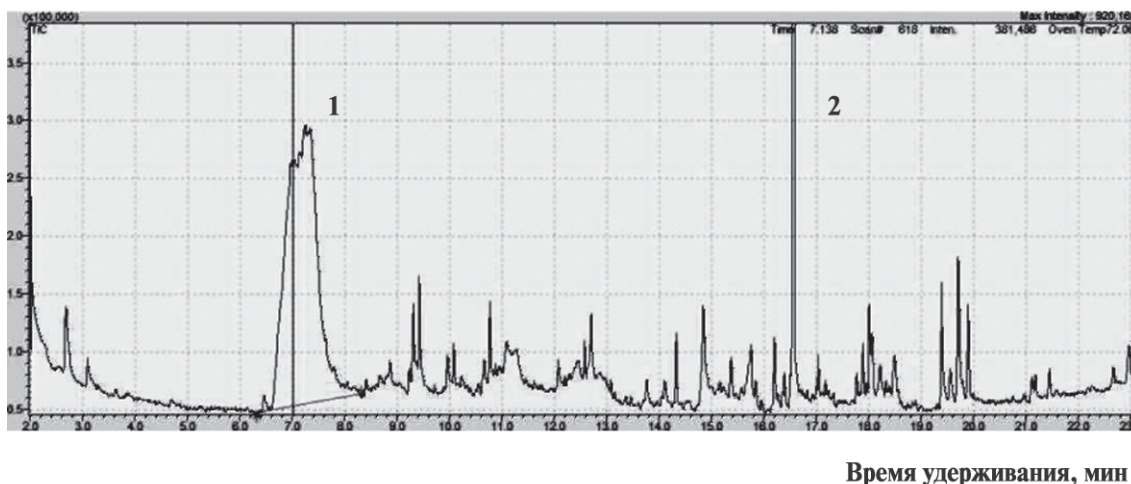
Надосадочная жидкость нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, вводимая животным 3 и 6 групп до и после их инфицирования патогенными иерсиниями,

Таблица.

Протективная эффективность надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл <i>L. plantarum</i> 8P-A3 при пероральном заражении белых мышей возбудителями псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=10)								
№ п/п	Группа животных	Микроорганизм, заражающая доза, (КОЕ)	Количество животных, особей...		Сроки гибели, сутки \bar{X} ($X_{\min} - X_{\max}$)	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ \cdot г ⁻¹		
			взятых в опыт	павших после инфицирования		выделенные микроорганизмы	начало эксперимента	25 (или в день гибели)
1	Контрольная		10	10	8,8 (5-13)	Общее количество	$(6,0 \pm 0,7) \cdot 10^9$	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^4$
						Бифидобактерии	$(6,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^2$
						Лактобациллы	$(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(1,3 \pm 0,5) \cdot 10^2$
						Эшерихии	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^1$
2	Лечение гентамицином через 24 часа после заражения в течение 6 дней	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 147, 10 LD ₅₀ ($8,5 \cdot 10^5$)	10	0	-	Общее количество	$(6,2 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$
						Бифидобактерии	$(6,3 \pm 0,7) \cdot 10^6$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^4$
						Лактобациллы	$(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(7,7 \pm 0,7) \cdot 10^4$
						Эшерихии	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^3$
3	Введение per os надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл за 5 дней до заражения и в течение 6 дней после заражения		10	0	-	Общее количество	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(8,4 \pm 0,6) \cdot 10^9$
						Бифидобактерии	$(6,4 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(6,9 \pm 0,7) \cdot 10^7$
						Лактобациллы	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^8$	$(5,5 \pm 0,6) \cdot 10^8$
						Эшерихии	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^4$
4	Контрольная		10	10	11,0 (8-15)	Общее количество	$(6,4 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^4$
						Бифидобактерии	$(6,6 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(1,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$
						Лактобациллы	$(2,5 \pm 0,7) \cdot 10^8$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^2$
						Эшерихии	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^1$
5	Лечение гентамицином через 24 часа после заражения в течение 6 дней	<i>Y. enterocolitica</i> 1407, 10 LD ₅₀ ($7,4 \cdot 10^8$)	10	0	-	Общее количество	$(6,8 \pm 0,6) \cdot 10^9$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^6$
						Бифидобактерии	$(6,5 \pm 0,8) \cdot 10^6$	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$
						Лактобациллы	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(7,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$
						Эшерихии	$(1,7 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,6) \cdot 10^3$
6	Введение per os надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл за 5 дней до заражения и в течение 6 дней после заражения		10	0	-	Общее количество	$(6,0 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(8,2 \pm 0,5) \cdot 10^9$
						Бифидобактерии	$(6,4 \pm 0,7) \cdot 10^6$	$(6,8 \pm 0,6) \cdot 10^7$
						Лактобациллы	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(5,8 \pm 0,6) \cdot 10^8$
						Эшерихии	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^4$

Примечание – В таблице приведены результаты определения содержания бактерий, выделенных из кишечного содержимого погибших животных в группах 1 и 4 (контроль); в группах 2, 3, 5, 6 (опыт) на 25 сутки эксперимента

Полный ионный ток, мА



Время удерживания, мин

Рисунок 3 – Анализ компонентов надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 методом газожидкостной хроматографии (1- молочная кислота, 2 - 1,2а-пиперазин-1,4-дион)

обеспечила купирование инфекционного процесса, предотвращение гибели животных и развитие дисбактериоза кишечника.

Результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* подтвердили существование антагонистической активности у лактобацилл [21, 22] и предопределили изучение состава надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, обладающей антибактериальной активностью (рисунок 3).

Исходя из приведенной на рисунке 3 хроматограммы определения состава надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, можно с уверенностью утверждать, что основным ее компонентом является молочная кислота, а также гексагидропиррол [1,2а-пиперазин-1,4-дион], входивший в состав питательной среды.

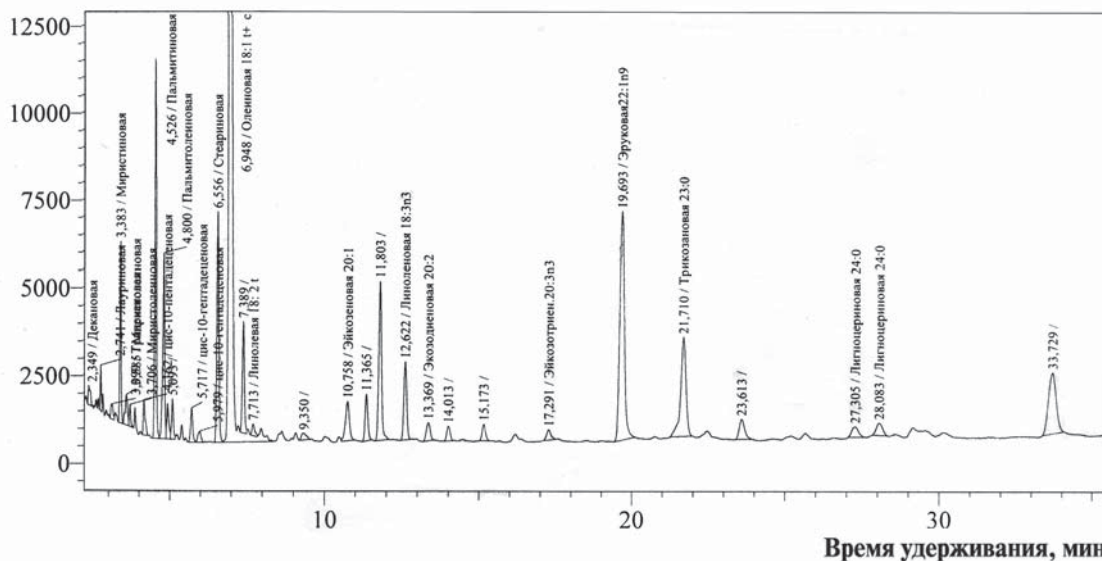
Среди менее значимых компонентов надосадочной жидкости следует назвать дипептиды, азотистые соединения, аминокислоты (в частности, пролин), а также длинноцепочечные жирные кислоты, например октаде-

кановая (стеариновая) жирная кислота, которые в сумме составляют не более 15 % всего пула компонентов надосадочной жидкости.

Прецизионное определение жирнокислотного состава надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 (рисунок 4) позволило установить, что из всего спектра жирных кислот в наибольшем количестве (площадь, %) определяются такие жирные кислоты, как олеиновая [цис-9-октадеценевая] кислота (48,7744 %), эруковая [одноосновная карбоновая] кислота (9,0494 %), пальмитиновая [гексадекановая] кислота (5,0898 %), трикозановая [одноосновная карбоновая] кислота алифатического ряда (4,5723 %), стеариновая [октадекановая] кислота (4,0357 %).

В меньших количествах определяются и другие жирные кислоты: пальмитолеиновая [мононенасыщенная] кислота (2,9828 %), миристиновая [тетрадекановая] кислота (1,9703 %), линоленовая [одноосновная карбоновая] кислота (1,9171 %), а также неидентифицированные жирные кислоты (4,0336 %, 3,7655 %, 1,9818 %) и другие.

Полный ионный ток, мА



Время удерживания, мин

Рисунок 4 – Анализ метиловых эфиров жирных кислот надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 методом газожидкостной хроматографии

Короткоцепочечные жирные кислоты с длиной углеродной цепи от 2 до 6 атомов углерода (уксусная, пропионовая, масляная, валериановая, капроновая) и их изомеры, представляющие собой конечные продукты метаболизма сахаролитических и протеолитических микроорганизмов кишечника [2, 3] не были обнаружены в надосадочной жидкости. В надосадочной жидкости также не было выявлено перекиси водорода (определение по ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения. Методы, средства и режимы»).

Обсуждение полученных результатов

Анализируя биологические свойства лактобацилл, Н.А. Глушанова [22] констатирует, что одним из наиболее известных биологических свойств является выраженная способность к продукции молочной кислоты. При этом указывается, что антагонизм молочнокислых бактерий в отношении других микроорганизмов обусловлен образованием не только молочной кислоты, но и продукцией ряда антимикробных и антибиотикоподобных соединений: лизоцима, перекиси водорода, бактериоцинов (лактацинов), короткоцепочечных жирных кислот, диацетила, а также гистамина и других аминов [24].

Спектр угнетающей активности продуктов метаболизма молочнокислых бактерий включает сальмонеллы, шигеллы, клостридии, псевдомонады, стафилококки, стрептококки, листерии, некоторые виды грибов [21, 22]. Наиболее выражена эта активность, по данным М.В. Тюрина и соавторов [21], у таких видов, как *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentii*, *L. casei*, *L. buchneri*.

Как показано в наших экспериментах, продукты метаболизма лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 проявили антибактериальную активность в отношении патогенных иерсиний псевдотуберкулёза (*Y. pseudotuberculosis* 147) и кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica* 1407) как в опытах *in vitro*, так и *in vivo*. Надосадочная жидкость, содержащая продукты метаболизма *L. plantarum* 8P-A3, получена центрифугированием нативной культуры лактобацилл, выращенной в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С. Именно состав питательной среды и условия культивирования, согласно опубликованным данным [22, 25], определили антибактериальную активность, в том числе активность кислотообразования.

Анализ состава надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 позволил установить, что основным её компонентом является молочная кислота. Кроме того, в состав надосадочной жидкости входят также такие жирные кислоты, как олеиновая, эруковая, пальмитиновая, трикозановая, стеариновая, пальмитолеиновая, миристиновая, линоленовая и другие, в том числе неидентифицированные.

Перекись водорода в надосадочной жидкости не выявлена. Очевидно, что выраженная антибактериальная активность надосадочной жидкости обусловлена сочетанным действием молочной кислоты и перечисленных жирных кислот. Весьма интересно то, что в составе идентифицированных жирных кислот нет короткоцепочечных жирных кислот, которые образуются в кишечнике под влиянием индигенной микрофлоры, в том числе и лактобацилл.

Интересно и другое: надосадочная жидкость нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 подавляет рост не только бактерий псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза, что наглядно продемонстрировано образованием зон ингибирования роста соответствующей культуры (рисунок 1), но и рост своих собственных лактобацилл (рисунок 2).

Таким образом, у лактобацилл нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 методом газожидкостной хроматографии 8P-A3 отсутствует «иммунность» к собственным продуктам метаболизма в нативной культуре. Не исключено, что и в кишечнике пробиотические лактобациллы, поступающие в составе пробиотика Лактбактерин, могут испытывать негативное влияние на рост и физиологические функции со стороны своих собственных экзометаболитов.

В отличие от лактобацилл, бактерии, к примеру, чумного микроба, продуцирующие *in vivo* и *in vitro* бактериоцины пестицины, являются иммунными к нему вследствие генетической обусловленности этого состояния наличием гена иммунности в составе плазмиды pPst [26]. Сам же пестицин обеспечивает определенное экологическое преимущество внеорганизменным популяциям *Yersinia pestis*.

Опыты *in vitro* наталкивают на мысль о возможном участии экзогенных метаболитов лактобацилл в формировании и поддержании колонизационной резистентности слизистой кишечника [27, 28]. Продемонстрированная в наших экспериментах протективная эффективность надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, введенной *per os* конвенциональным белым мышам, инфицированным возбудителями псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза, со всей очевидностью доказала вероятность блокирования рецепторов эпителиальных клеток слизистых оболочек кишечника, предотвращения адгезии патогенных иерсиний и начального этапа инфекционного процесса [29]. Именно этим обстоятельством можно объяснить факт выживания подопытных животных и отсутствие дисбиотических нарушений в составе их кишечной микрофлоры.

Действительно, входящая в состав надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 молочная кислота оказывает в организме антимикробный эффект, регулирует уровень кислотности в пищеварительном тракте, выполняет роль «эндогенного слабительного», регулирует моторную и секреторную активность кишечника [22, 27, 29].

В совокупности с другими компонентами, входящими в состав надосадочной жидкости и являющимися метаболитами лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, молочная кислота, как это следует из опубликованных данных [30], препятствует образованию медиаторов воспаления, стимулируемых ферментами патогенных иерсиний, что предупреждает увеличение проницаемости клеточных мембран, гипоксию тканей, нарушение микроциркуляции и свертываемости крови, ведущих к снижению барьерной функции слизистой оболочки кишечника и возможности транслокации патогенных бактерий.

В заключение необходимо отметить следующее. Лактобациллы благодаря своим биологическим свойствам представляют значительный научный и практический интерес. Они широко распространены в окружающей среде, являются составной частью нормальной микрофлоры животных и человека. В то же время все дисбиотические нарушения в составе кишечной микрофлоры обязательно сказываются на лактобациллах, и в первую очередь на их численном составе.

С другой стороны, лактобациллы нашли широкое применение для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных [22]. И как показано настоящими исследованиями, их лечебно-профилактический потенциал далеко не исчерпан, в том числе в направлении практического использования синтезируемых ими экзометаболитов.

Выводы

1. Получена надосадочная жидкость нативной культуры пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 с концентрацией бактериальных клеток $3,2 \cdot 10^9$ КОЕ \cdot мл⁻¹, предназначенная для изучения её состава и оценки антибактериальной активности в опытах *in vitro* и *in vivo*.

2. Изучен состав надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 с использованием газожидкостной хроматографии, в том числе состав жирных кислот. Основным компонентом надосадочной жидкости является молочная кислота, в её составе также присутствуют дипептиды, азотистые соединения и аминокислоты. Спектр жирных кислот представлен олеиновой, эруковой, пальмитиновой, трикозановой, стеариновой, пальмитолеиновой, миристиновой, линоленовой и другими кислотами.

3. В экспериментах, выполненных с использованием дискодиффузионного метода, выявлена антибактериальная активность надосадочной жидкости в отношении бактерий псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Бактериальные клетки *L. plantarum* 8P-A3 чувствительны к собственным экзометаболитам, входящим в состав надосадочной жидкости нативной культуры, выращенной в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С.

4. Надосадочная жидкость нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3, освобожденная центрифугированием от лактобацилл, характеризуется хорошей переносимостью и отсутствием побочных эффектов при пероральном введении конвенциональным белым мышам.

5. Установлена протективная эффективность надосадочной жидкости нативной культуры пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 при пероральном введении конвенциональным белым мышам, зараженным энтерально суспензиями бактерий *Y. pseudotuberculosis* 147 и *Y. enterocolitica* 1407 в дозе 10 LD₅₀.

6. Бактериологическое изучение фекалий выживших в опыте перорального инфицирования суспензиями бактерий *Y. pseudotuberculosis* 147 и *Y. enterocolitica* 1407 конвенциональных белых мышей не выявило дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры на фоне перорального введения животным надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91599.11.0004-2003), утв. приказом № 231 МЗ РФ от 09.06.2003 г. М., 2003.
2. Юшук Н.Д., Ценева Г.Я., Кареткина Г.Н., Бродов Л.Е. Иерсиниозы. М.: Медицина; 2003; 208 с.
3. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.П., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. — 2-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина; 2001; 256 с.
4. Звягинцева Т.Д., Мирзоева Л.А. Кишечный иерсиниоз: особенности течения, диагностика, принципы лечения. Здоровье Украины 2008; (6/1): 72-73.
5. Захаренко С.М., Фоминых Ю.А., Мехтиев С.Н. Инфекции, микробиота кишечника человека и метаболический синдром. Эффективная фармтерапия. Гастроэнтерология 2012; 3: 14-20.
6. Ценева Г.Я., Полоцкий Ю.Е., Клеганов В.К., Ефремов В.Е. Выбор моделей для определения патогенных свойств возбудителя псевдотуберкулеза. Журн микробиол 1982; (11): 68-71.
7. Ценева Г.Я., Полоцкий Ю.Е., Дмитриева Г.М., Полоцкий В.Ю. Характеристика инвазивности возбудителя псевдотуберкулеза. Журн микробиол 1984; (5): 26-30.
8. Маракулин И.В., Дармов И.В., Погорельский И.П., Дробков В.И., Паутов В.Н. Экспериментальная модель псевдотуберкулезной инфекции у обезьян. Бюл. эксп. биол. и мед. 1994; 118 (7): 59-62.

9. Pepe J.C., Miller V.Z. *Yersinia enterocolitica* invasion: a primary role in the initiation of infection. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1993; 90: 6473-6477.
10. Darwin A., Miller V.Z. Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature tagget transposon mutagenesis. Mol Microbiol 1999; 32: 51-62.
11. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дармов И.В., Маракулин И.В. Экспериментальный псевдотуберкулез: оценка возможности профилактики, лечения и коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры. Журн инфектологии 2012; (4): 71-79.
12. Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов. Фарматека 2003; (7): 56-63.
13. Вахитов Т.Я., Момот Т.Н., Шалаева О.Н., Петров Л.Н. Состав и биологическая активность экзометаболитов *Escherichia coli* M-17. Журн. микробиол. 2003; (6): 20-25.
14. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией. Журн. микробиол. 2004; (1): 84-92.
15. Аджигайтканова С.К. Подходы к медикаментозному лечению дисбактериоза кишечника. http://www.rmj.ru/articles_5634.htm.
16. Иванов В.П., Бойцов А.Г., Коваленко А.Г., Ластовка О.Н., Нилова Е.А. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо, СПб: Центр Госсанэпиднадзора, 2002; 31 с.
17. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода *Lactobacillus*. Журн микробиол 1992; (9-10): 74-78.
18. Jorgensen J.H., Turnidge J.D. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology. 9th-ed ASM Press Washington; 2007: 1152-1172.
19. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз, 1962; 280 с.
20. Максимов И.К. Нарушение микробиоценоза на фоне полихимиотерапии у больных опухолевыми заболеваниями системы крови: новые методы диагностики и коррекции. Фарматека 2004; (13): 79-84.
21. Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Рахимова Н.Г., Поспелова В.В., Лагода И.В. К механизму антагонистической активности лактобацилл. Журн. микробиол. 1989; (2): 3-8.
22. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл. Бюл. сибирской медицины 2003; (4): 50-58.
23. Белоусова Е.А., Никитина Н.В., Мишуrowsкая Т.С., Златкина А.Р. Возможности препаратов на основе микробных метаболитов для восстановления кишечной микробиоты *Consilium Medicum*. Гастроэнтерология 2005; 7 (1): 9-13.
24. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 3: Пробиотики и функциональное питание; М.: ГРАНТЬ, 2001. — 289 с.
25. Baintner F., Schmidt I., Szigeli I., Varga I. Die Wirkung von Na- und Ca-acrylat auf die milchsäuregärung und von buttermitteln mit unterschiedlicher vergarbarkeit. Wirtschaftseig Futter 1986; 32 (1): 93-99.
26. Мишанькин Б.Н., Гончарова Е.К., Марченков В.И., Кравцов А.Н., Сорокин В.М. Молекулярное клонирование плазмиды *Yersinia pestis*, детерминирующей синтез пестицина, белка иммунитета, фибринолизина и коагулазы. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 1984; (10): 12-16.
27. Ленцнер А.А. Лактофлора животного организма и ее защитная функция. Теоретич. и практич. проблемы биологии; М.: Агропромиздат, 1986: 195-200.
28. Freter R., De Maclas M.E. Factors affecting the colonization of the gut by lactobacilli and other bacteria. Probiotics: prospects of the use in opportunistic infections. Old Herbarium University Seminar. Monograph. Ind. Microbiol., Pvoicem., Herborn-Dill. Germany; 1995: 19-34.
29. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э., Тюри М.Э., Брилене Т.А., Брилене В.И., Левков А.А. Лактофлора и колонизационная резистентность. Антибиот. и мед. биотехнол. 1987; 32 (3): 173-179.
30. Бондаренко В.М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях *Consilium Medicum*. Гастроэнтерология 2005; 7 (6): 41-45.