

УДК 579.864.1:615.331:616.992.282(045)

«АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ В ОТНОШЕНИИ ГРИБОВ ВИДА *CANDIDA ALBICANS* В УСЛОВИЯХ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ»

Кряквина Е.В., Неборская Ю.А., Мартиросян Е.А., Фатуллаева Г.А., Шаповал О.Г.
ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Статья посвящена изучению взаимоотношений между микроорганизмами, в частности пробиотических лактобацилл и грибов вида *Candida albicans*.

На современном этапе взаимоотношения между микроорганизмами рассматриваются комплексно, изучаются механизмы контакта со стороны каждого участвующего в них вида. Целью исследования послужила оценка антагонистической активности пробиотических лактобацилл в отношении штаммов грибов вида *Candida albicans* с использованием двух методов: совместного культивирования на твердой питательной среде, совместного инкубирования в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия и жидкой питательной среде. Об антагонистической активности судили в первом случае по количеству выросших после двухсуточной инкубации при температуре 37°C колоний шести видов кандид на поверхности лактоагара, глубинно засеянного культурами синбиотического препарата, во втором случае – по тому же показателю, полученному после мерного высева из коинкубационной смеси тест-штаммов четырех видов кандид и одного вида лактобацилл в физиологическом растворе и сахарном бульоне. Степень антагонистической активности оценивалась по снижению количества колоний на один-несколько порядков в опытных посевах по сравнению с контролем. Следует отметить, что упомянутые разные условия эксперимента реализованы в разное время и на разных штаммах грибов и лактобацилл.

Установлено, что при совместном культивировании штаммов на лактоагаре количество колоний по сравнению с контролями значительно снизилось у пяти штаммов грибов и существенно не изменилось у одного штамма. В условиях совместного инкубирования штамм лактобактерий проявил слабую антагонистическую активность только в отношении одного вида дрожжеподобных грибов в обоих условиях инкубирования. В отношении других видов антагонистическая активность не была выявлена. Кроме того, отмечалось снижение количества лактобактерий по сравнению с грибами в условиях совместного инкубирования как в физиологическом растворе хлорида натрия, так и в питательной среде.

Таким образом, при изучении антагонистической активности лактобактерий и грибов рода *Candida* привычные роли штамма-ингибитора и штамма-мишени могут быть изменены.

Ключевые слова: лактобациллы, *Candida*, антагонистическая активность.

«ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PROBIOTIC STRAINS OF LACTOBACILLI AGAINST FUNGI OF THE SPECIES *CANDIDA ALBICANS* IN CONDITIONS OF COCULTIVATION»

Kriakvina E.V., Neborskaya Y.A., Martirosyan E.A., Fatullaeva G.A., Shapoval O.G.
Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Saratov

The article is devoted to the studying of the relationship between microorganisms, in particular probiotic lactobacilli and fungi of the species *Candida albicans*.

At present interactions between microorganisms are complexly assessed, contact mechanisms of them are studied from the side of each participant, including antagonistic activity. The goal of the research is an assesment of antagonistic activity of probiotic lactobacilli against clinical strains of *Candida albicans*, using two assays: cocultivation on nutrient agar, coincubation in sterile physiological solution of sodium chloride and nutrient broth. For the first assay antagonistic activity was studied according to numbers of colonies of six *Candida* species in 48-hour of incubation at the temperature 37°C on the surface of deeply inoculated with the synbyotic lactoagar plates, for the second assay – to numbers of isolated colonies obtained after measuring inoculation of the four *Candida* and one lactobacilli test strains suspensions in the sterile physiological solution and sugar broth. Both assays were released on different fungi and lactobacilli strains.

After the cocultivation of the test strains on the lactoagar plates a number of the colonies of five *Candida* species was significantly less than control ones. It was not changed for one *Candida* strain.

In conditions of coincubation the strain of lactobacilli showed weak antagonistic activity against one *Candida* species in the sugar broth and the physiological solution. Against other fungal species the activity has not been determined. Moreover, the decreasing of lactobacilli colonies number was noted after incubation in both conditions with three test *Candida* strains.

Thus, familiar roles of a strain-inhibitor and a target strain should be changed for studying of antagonistic activity of lactobacteria and fungi.

Key words: lactobacilli, *Candida*, antagonistic activity

Пробиотические штаммы продолжают использоваться в практической медицине для коррекции дисбиоза различных биотопов макроорганизма. Различные виды лактобактерий, в частности представители рода *Lactobacillus* семейства *Lactobacillaceae*, являются основой пробиотических препаратов. Их антагонистическая активность обусловлена образованием органических кислот, перекиси водорода, бактериоцинов и др. соединений [1, 6, 9]. Ее наличие установлено в отношении различных видов микроорганизмов, включая грамотрицательные и грамположительные бактерии, а также грибы (фунгицидная активность присуща гидроксипроизводным жирных кислот, бензойной кислоте, циклическим дипептидам и другим веществам, продуцируемым лактобациллами) [1, 6, 10].

Среди последних грибы рода *Candida* являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, ротовой полости и нижних отделов мочеполовой системы, становясь причиной воспалительных поражений слизистых, а в ряде случаев, и системных инфекций. Однако вопрос об антагонистической активности лактобацилл в отношении грибов рода *Candida* имеет противоречивые ответы, что, очевидно, связано с продолжающимся изучением взаимодействия между этими микроорганизмами. Одни авторы установили ее наличие, другие – нет [6, 7]. К тому же при ее изучении используются различные методы.

Поэтому целью данного исследования явилось определение антагонистической активности пробиотических штаммов лактобактерий в отношении клинических штаммов кандид с использованием разных методов, для осуществления которой предстояло решить следующие задачи – выделить чистые культуры штаммов грибов, пробиотических штаммов лактобацилл и реализовать выбранные методы: 1) совместное культивирование на твердой питательной среде; 2) совместное инкубирование в стерильном физиологическом растворе и, для сравнения, в жидкой питательной среде.

Для реализации первого метода в работе использован лиофилизат синбиотического препарата «Максилак бэби» НПО «Микроген», Россия, 6 клинических штамма грибов *Candida albicans*, выделенных из носоглотки и полости рта новорожденных детей, для реализации второго - 1 штамм лактобацилл (*Lactobacillus fermentum*), выделенный из препарата «Лактобактерин» НПО «Микроген», Россия, 4 клинических штамма грибов *Candida albicans*, выделенных из влагалищного отделяемого беременных женщин.

Совместное культивирование опытных штаммов на твердой питательной среде осуществляли по собственной опытным путем подобранной методике, создающей условия как из метода двухслойного агара благодаря возможности растущим культурам контактировать с метаболитами друг друга, так и метода посева штрихами, при котором культуры находятся на достаточно близком друг от друга расстоянии. На основе препарата

«Максилак бэби» готовили суспензию в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия. С той целью к 0,1г взвешенного в стерильной посуде лиофилизата добавляли 9,9мл стерильного физиологического раствора, через 15 минут тщательно перемешивали стерильной палочкой и раскапывали по 0,5мл в стерильные чашки Петри диаметром 95мм. Затем в каждую чашку добавляли по 20 мл расплавленного теплого стерильного лактоагара и перемешивали с суспензией вращательными движениями на плоскости.

После застывания агара на его поверхность мерной петлей (10мкл) наносили приготовленную на стерильном физиологическом растворе суспензию 48-часовой культуру кандид (10⁵ КОЕ/мл), предварительно субкультивированных на лактоагаре, и распределяли прокаленным и остуженным шпателем. В качестве контроля использовали посеvy кандид на лактоагаре при отсутствии пробиотических штаммов, а также посев синбиотического препарата в лактоагар без кандид.

Посевы инкубировали в аэробной атмосфере при температуре 37°С в течение 48 часов, затем подсчитывали количество выросших на поверхности агара колоний дрожжеподобных грибов при наличии роста пробиотических штаммов в толще питательной среды.

Метод совместного инкубирования штаммов предполагает смешивание в пробирке одинаковых объемов суспензий суточных культур концентрацией 10⁹ КОЕ/мл и инкубирование в течение суток с последующим мерным высевом на твердые среды для подсчета выросших колоний [8,10]. Культуру лактобацилл выделяли мерным посевом десятикратного разведения пробиотического препарата (10⁻⁴-10⁻⁵) в лактоагар в чашках Петри [2]. Предварительное культивирование штаммов (трехкратные пересевы двухсуточных культур) осуществляли в столбиках лактоагара в аэробных условиях при температуре 37°С. Дополнительно нами использовано инкубирование штаммов в жидкой питательной среде (в сахарном бульоне). Из двухсуточных культур тест-штаммов готовили суспензии указанной концентрации по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, смешивали по 2мл каждой в пробирке и через 24 часа инкубации при 37°С в аэробной атмосфере делали трехкратный мерный посев (10 мкл) на лактоагар в чашках Петри. Через 48 часов подсчитывали количество выросших колоний грибов и лактобактерий, для дополнительной дифференцировки выросших культур готовили мазки, окрашенные по методу Грама. В качестве контролей использовали суспензии лактобактерий и суспензии грибов в чистой культуре. Для совместного инкубирования штаммов в жидкой питательной среде по 10 мкл приготовленной суспензии засеивали в 2 мл сахарного бульона для инкубирования в чистой культуре и 4 мл среды для совместного инкубирования.

Антагонистическая активность оценивалась как слабая в случае уменьшения количества колоний грибов по сравнению с контролем на 0,6-3,2 lg, как умеренная – на 3,4-5,8 lg и высокая – на 5,9-6,5 lg [9].

Результаты.

При совместном культивировании штаммов на твердой питательной среде на всех чашках с лактоагаром отмечался видимый рост пробиотических штаммов в виде газона внутри пласта среды без выхода на поверхность. Количество колоний грибов в контрольных посевах соответствовало 10^3 КОЕ. В условиях совместного культивирования только у одного штамма кандид количество выросших колоний не отличалось от контроля, у остальных штаммов оно оказалось ниже: на один порядок у одного и на 2 порядка у четырех, что соответствует слабой антагонистической активности.

При совместном инкубировании в физиологическом растворе антагонистическая активность лактобактерий проявилась только в отношении 1 штамма гриба (количество клеток было снижено по сравнению с контролем на 0,6 lg), аналогичные данные были получены при совместном культивировании в сахарном бульоне. Также отмечено преобладание количества колоний остальных штаммов грибов над количеством лактобактерий в обоих условиях культивирования на 2 – 3 lg.

Заключение.

Таким образом, синбиотические штаммы лактобацилл по результатам используемого нами метода совместного культивирования на твердой питательной среде обладают слабой антагонистической активностью в отношении опытных штаммов кандид. Это может быть обусловлено и комплексным посевом синбиотика без выделения чистых культур его лактобацилл. Следует отметить, что данный подход уже осуществлялся нами путем посева десятикратных разведений синбиотического препарата в слой лактоагара с последующей инкубацией в аэробных условиях и пересевом отдельных выросших колоний в МРС-бульон в стерильные центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками и столбики лактоагара для получения биомассы для приготовления суспензии инокулюма чистой культуры. Но, в отличие от лиофилизата, она не дает газонного роста культуры и, поэтому, заметной антагонистической активности.

Отсутствие антагонистической активности чистой культуры лактобактерий в отношении 3х штаммов грибов при совместном инкубировании как физиологическом растворе, так и в сахарном бульоне может быть обусловлена их устойчивостью к метаболитам лактобацилл, которые могут синтезироваться в питательной среде размножающейся популяцией или вовсе отсутствовать при данных условиях инкубирования. Следует отметить, что у беременных при нормоценозе и кандидозном поражении влагалища, согласно данным литературы, *L.fermentum*

выделяется, но не относится к доминирующим видам данного биотопа (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*), в случае кандидозного вагинита, однако *L.fermentum* занимает 4 место по частоте выделяемости [5]. Поэтому для них может быть не характерна активная выработка фунгицидных метаболитов.

Главным же представляется тот факт, что в литературе имеются сведения о различных типах взаимодействия в смешанных бульонных культурах между представителями рода *Lactobacillus* и грибами рода *Candida*, изучаемых в настоящее время и не обязательно носящих антагонистический характер [3,4]. Наличие антагонистической активности лактобацилл при инкубировании в жидкой среде только в отношении одного штамма кандид обусловлено, очевидно механизмами кворум-сенсинга, которые функционируют у сочетаний одних и тех же таксономических групп по-разному и, зависят, от конкретного штамма [3,4].

Отсутствие антагонистической активности лактобактерий в отношении трех штаммов грибов при использовании второго метода – совместного инкубирования в жидкой фазе еще и с количественным преобладанием кандид может быть обусловлено накапливаемыми в настоящее время данными о необходимости пересмотра концепции однонаправленного влияния штаммов одного вида микроорганизмов на другой вид (например, антагонизм лактобацилл – потенциальных «штаммов-ингибиторов» в отношении кандид – ожидаемых штаммов-мишеней) в концепцию взаимовлияния разных видов друг на друга.

Список литературы:

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. 2003. Т.2. №4. С.50-58.
2. Красникова Л.В., Гунькова П.И., Маркелова В.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие. СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. 85 с.
3. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Взаимодействие пулов лактобацилл и кандид из одного и того же биотопа приводит к видзависимому упорядочиванию биопленкообразования в смешанных культурах: выявление трех микрэкосистем функционально близкой группы кандид (*C.albicans* и *C.tropicalis*). Клиническая лабораторная диагностика. 2014. №9. С.83-84.
4. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Прогнозирование влияния пулов кандид на биопленкообразование видами лактобацилл из одного и того же биотопа. Клиническая лабораторная диагностика. 2014. №9. С.84-85.
5. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С. и др. Видовой состав лактобактерий при различных состояниях микробиоты влагалища у беременных. КМАХ. 2013. Т.15. №1. С.72-79.

6. Полянская И.С., Стоянова Л.Г., Семенихина В.Ф. Антагонистическая активность пробиотических штаммов: факторы регулирования. Молочная промышленность. 2017. №1. С.42-44.
7. Черкасов С.В., Семенов А.В. Микробная регуляция антагонистической активности лактобактерий. Сибирский медицинский журнал. 2012. №2. С.79-82.
8. Чернявская Е.Ф., Дутко А.А., Белясова Н.А. Усовершенствованный метод обнаружения бактерий – антагонистов среди пробиотически ценных штаммов/Вести национальной Академии наук Белоруссии, серия Биологические науки. 2013. №1. С.73 – 77.
9. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens / P. Hütt, J. Shchepetova, K. Lõivukene at all // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – V. 100. – P. 1324–1332
10. Bergey's manual of systematic bacteriology / edited by Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones at all. – New York: Springer-Verlag, 2009. – V.3. – 1450 p.