

НЕКОТОРЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SPP. LACTIS* A7, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ ГРУДНОГО МОЛОКА

С.Г. Гюльяхмедов^{1*}, Н.А. Абдуллаева¹, В.Ш. Назарли¹, А.А. Кулиев¹

¹Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан

SOME PROBIOTIC PROPERTIES *LACTOBACILLUS DELBRUECKII SPP. LACTIS* A7, ISOLATED FROM BREAST MILK

S.G. Gulahmadov, N.A. Abdullaeva, V.Sh. Nazarli, A.A. Kuliev (Baku State University, Baku, Azerbaijan)

Резюме. Бактериоциногенный штамм *Lactobacillus delbrueckii spp.lactis* A7 был изолирован из грудного молока. Он был устойчив к влиянию среды с pH 3.5 и рос в присутствии 0,3% желчной кислоты. Клетки данного штамма проявляли чувствительность к различным антибиотикам, обладающим разного направления ингибирующего действия.

Abstract. Bakteriotsinogenic strain *Lactobacillus delbrueckii spp.lactis* A7 was isolated from breast milk. It was resistant to the effects of a pH 3.5 medium and grown in the presence of 0.3% bile acid. Cells of this strain showed sensitivity to various antibiotics possessing inhibitory effect of different directions.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пробиотики, устойчивость к желчным кислотам, антибиотики.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, bile salt tolerance, antibiotics.

*Сахиб Гюльяхмедов, д.б.н., кафедра Биохимии и Биотехнологии, Биологический факультет, Бакинский Государственный Университет, Баку, Азербайджан, e-mail: sahib66@rambler.ru

Поступила в редакцию: 24 Мая 2017

1. Введение

В процессе формирования первичных микробных популяций в пищеварительной системе новорожденных детей ключевую роль играет материнское молоко, которое является единственным источником их питания [4-7]. Оно изменяет кишечную микрофлору при развитии детей грудного возраста. Грудное молоко признано решающим элементом, который модулирует метаболическое и иммунологическое программирование здоровья детей в постнатальном периоде [1, 2]. Оно содержит ряд функциональных и защитных питательных веществ, создающий правильную микросреду для развития и созревания микробиомы кишечника [2, 7]. Кроме того, грудное молоко содержит ряд других факторов, таких как лизоцим, лактоферрин, олигосахариды и т.д., которые помогают в предотвращении инфекции и поддержании роста полезных бактерий [11].

По литературным данным, микробный состав грудного молока не постоянный и меняется в зависимости от периода лактации, веса матери, от формы рода (естественным путем или Кесарево сечением), питания, а также разные микробные инфекции в беременный период [2].

Однако, факторы, влияющие на микробиому грудного молока, а также потенциальное влияние этих микробов на здоровье новорожденных пока точно не установлены. Изолирование и исследование пробиотических свойств этих бактерий и добавление их в состав детских пищевых продуктов позволяли бы предотвратить ряд педиатрических проблем в медицине.

В настоящей работе мы исследовали некоторые пробиотические свойства штамма *L.delbrueckii spp.lactis* A7, изолированного из грудного молока.

2. Материалы и методы

Штамм *L.delbrueckii spp.lactis* A7 был изолирован из грудного молока матери, состоящей на учете в одной из поликлиник г. Баку. Чистую культуру штамма хранили в виде сток культуры при температуре -20°C в MRS-среде, содержащей 15% (по объему) глицерина. Перед использованием штамм дважды культивировали в той же питательной среде в течение суток при $+37^{\circ}\text{C}$.

Для определения влияние рН среды на рост штамма, его культивировали в MRS бульоне с модифицированными, при помощи 1 М HCl или 1 М NaOH, значениями рН 2.5, 3.0, 3.5 и 4.0. Культивирование проводили 14 часов при 36°C . За ростом культуры следили с помощью спектрофотометра при длине волны 600 нм.

Для определения устойчивости к желчным кислотам штамм инкубировали в MRS бульоне в присутствии различных концентраций тауродезоксихолевой кислоты ТДХК (0,1; 0,3; 0,5 и 1%). В качестве контроля использовали культуры штамма, выращенного в бульоне в отсутствие желчных кислот.

Чувствительность к антибиотикам проверяли методом диск-диффузии. Использованные антибиотики, их количество и интерпретация чувствительности к ним суммированы в таблице. Использовали концентрации антибиотиков от 5 до 30 мкг/мл. Свежую культуру штамма разводили в MRS среде десятикратно, высевали на стандартном Мюллер-Хинтон агаре [6]. Перед настилкой дисков с антибиотиками, чашки держали 30 мин при комнатной температуре, затем инкубировали 24 ч при $+37^{\circ}\text{C}$. Результаты из трех испытаний интерпретировали в соответствии с Научным комитетом Европейской комиссии по питанию животных.

3. Результаты и обсуждение

Возможность использования МКБ в качестве пробиотиков требует многочисленные исследования, требующие экспериментальные доказательства, как их полезных свойств, так и безопасность в целом [5].

Одной из главных причин успешной реализации кисломолочных продуктов среди населения является присутствие в их составе бактерий - пробиотиков, живых бактерий, оказывающих положительный эффект на здоровье человека. Бактерии - пробиотики должны сохранять свою живучесть при прохождении через отдельные органы пищеварительного канала. По этому, одним из основных критерий технологической пригодности пробиотиков является их толерантность к низким значениям рН среды и способность расти в присутствии различных концентраций желчных кислот [6]. Пробиотики подвергаются воздействию кислотного стресса при прохождении через желудок, где значение рН составляет 3,5 и ниже [13]. Исходя из этого, мы изучали динамику роста бактериоциногенного штамма *L.delbrueckii spp.lactis* А7 в различных значениях рН среды. С этой целью для определения общей толерантности к кислотному стрессу было проверено влияние значений рН в МРС среде в пределах от 2,5 до 4.0. Временная экспозиция данных опытов превосходила предел, соответствующий времени прохождения пищи через желудок человека, который составляет 1,5–2 часа [2].

На рис. 1 отражены результаты исследований по изучению кислотного стресса на рост исследуемого штамма. Из представленных на рис. 1 графиков следует, что динамика роста штамма при различных концентрациях ионов водорода отличалась друг от друга.

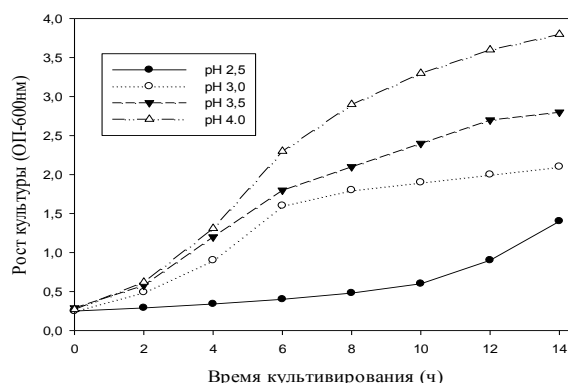


Рис. 1. Влияние pH среды на рост штамма *L.delbrueckii spp.lactis* A7

При значении рН 2,5 у исследуемого штамма обнаружили признаки слабого роста. Увеличение значение рН среды на 0,5 пунктов (рН3.0) привело к заметным изменениям в динамике роста. При таком значении рН ОП этой культуры увеличивалась до 8 раз. При значениях рН среды 3.5 и 4.0 наблюдался нормальный рост исследуемого штамма.

Таким образом, штамм *L.delbrueckii spp.lactis* А7 проявлял устойчивость к влиянию среды с рН 3.5, которое соответствует физиологическому уровню кислотности желудочного сока.

По мнению исследователей, некоторые фенотипические свойства МКБ, в том числе и их способность расти при низких значениях рН, зависит от источника изолирования этих штаммов [10, 11].

На наш взгляд, сильное колебание значения рН в среде обитания микроорганизмов могло бы индуцировать адаптивных ответных реакций, которые могли бы способствовать их выживанию и сохранению численности популяций.

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние различных концентраций натриевой соли ТДХК (0,1%, 0,3%, 0,5% и 1%) на рост штамма А7. Результаты этих опытов отражены на рис. 2. Из этого рисунка видно, что присутствие минимальной концентрации (0,1%) исследуемого фактора не повлияло на рост изучаемого штамма.

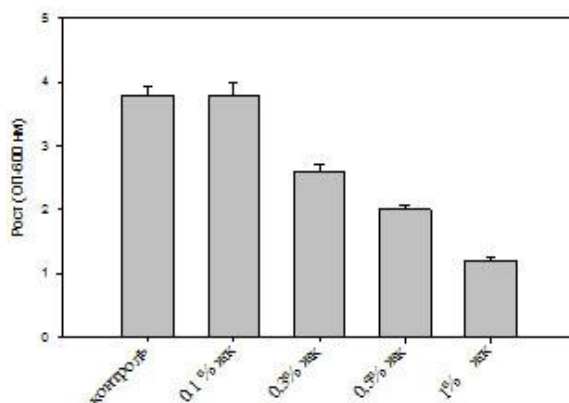


Рис. 2. Влияние различных концентраций Na-ТДХК на рост штамма *L.delbrueckii spp.lactis* А7. Время инкубации: 12 ч.

Повышение концентрации фактора до физиологического значения, которое в тонкой кишке человека составляет 0,3% [4], и выше (0,5%) приводило к ослаблению роста штамма А7 по сравнению с контрольным вариантом. При этом его рост оставался на достаточно высоком уровне для выполнения своего физиологического и биохимического функций.

Таким образом, исследуемый штамм может сохранять свою жизнеспособность при прохождении желудочно-кишечного тракта человека. Данный фенотип позволяют использовать этого штамма в качестве пробиотика.

В следующей части опытов мы исследовали влияние антибиотиков на рост изученного штамма. Результаты опытов по определению влияние антибиотиков на рост изученного штамма суммированы в таблице. Из таблицы следует, что штамм *L.delbrueckii spp.lactis* А7 проявлял чувствительность к 9 из проверенных 12 различных антибиотиков. Устойчивость этого штамма была обнаружена по отношению цефотаксима, хлорамфениколу и офлоксацину. Диаметры (d) чистой зоны вокруг дисков этих антибиотиков на газоне изученного бактериоциногенного штамма были 9 мм, 9 мм и 4 мм соответственно.

Таким образом, в этой серии экспериментов мы изучали влияние кислотного стресса, солей желчных кислот и различных антибиотиков на рост и сохранение жизнедеятельности штамма *L.delbrueckii spp.lactis* А7.

Таблица 1. Влияние антибиотиков на рост штамма *L.delbrueckii spp.lactis* A7

Группы антибиотиков	Антибиотики	d (мм) зоны интерпретации*			A7
	Название - конц. (мкг/мл)	Уст.	УЧ	Ч	d (мм) чистой зоны
Ингибиторы синтеза клеточных компонентов	Ампициллин – 10	≤ 12	13-15	≥ 16	18
	Цефотаксим – 30	≤ 14	15-22	≥ 23	4
	Пенициллин – 30	≤ 14	15-16	≥ 17	19
	Ванкомицин - 30	≤ 14	15-16	≥ 17	18
Ингибиторы синтеза белков	Хлорамфеникол-30	≤ 13	14-17	≥ 18	9
	Эритромицин - 15	≤ 13	14-17	≥ 18	19
	Гентамицин - 10	≤ 12	-----	≥ 13	16
	Канамицин - 30	≤ 13	14-17	≥ 18	24
	Стрептомицин -10	≤ 11	12-14	≥ 15	16
Ингибиторы синтеза ДНК	Рифамицин - 15	≤ 14	15-19	≥ 20	24
	Офлоксацин - 5	≤ 13	14-18	≥ 19	9
	Метродиназол	≤ 14	15-19	≥ 19	10

Примечание: У-устойчивость, УЧ-умеренная чувствительность, Ч-чувствительность

Установлено, что штамм устойчив к влиянию среды с pH 3.5, проявлял способность расти в присутствии 0,3% ТДХК. Клетки данного штамма проявляли чувствительность к различным антибиотикам, относящиеся ко всем трем группам, обладающим разного направления ингибирующего действия. Все эти свойства говорят о высоком прикладном значении данного бактериоциногенного штамма.

Литература

1. Гюльахмедов С.Г., Абдуллаева Н.А., Мустафаева Р.С., (2016) Виды молочнокислых бактерий, изолированных из различных образцов материнского молока, *Вестник Бакинского Университета*, 1, 54-60.
2. Хавкин А.И., (2007) Молочнокислые бактерии и здоровье ребёнка, Московский НИИ педиатрии и детской хирургии, *Частные вопросы педиатрии*, 9(1), 4-24.
3. Brandtzaeg P., (2009) “ABC” of mucosal immunology, Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program, 64, 23–38.
4. Barada N., (1991) *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit, *J. Dairy Sci.*, 74, 409-413.
5. Chang Y., Kim J., Kim H., et al., (2001) Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent *in vivo* studies, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 193–199.
6. Elsayed A., (2007) Characterization and Genetic Improvement of *Lactobacilli* for Application in Probiotic Products, PhD thesis, University of Kiel, Germany.

7. Hoppu U., Isolauri E., Laakso P., Matomaäki J., Laitinen K., (2012) Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines, *Eur. J. Nutr.*, 51, 211–219.
8. Hummel A., Hertel C., Holzapfel W., Franz C., (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3), 730-739.
9. Klaenhammer T., Kullen M., (1999) Selection and design of probiotics, *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 45–57.
10. Kos B., Suskovic J., Beganovic J. et al., (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 699–707.
11. Martín R., Olivares M., Marín M., and Fernández L., (2005) Probiotic Potential of 3 *Lactobacilli* Strains Isolated From Breast Milk, *Journal of Human Lactation*, 21(1), 8-17.
12. McAuliffe O., Cano R., Klaenhammer T., (2005) Genetic Analysis of Two Bile Salt Hydrolase Activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 71(8), 4925–4929.
13. Saxelin M., Tynkkynen S., Mattila-Sandholm T., de Vos W., (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 204–211.