

ИССЛЕДОВАНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА

Т.Н. Zandanova, P.A. Gogoleva

THE RESEARCH OF ADHESIVE ACTIVITY OF MICROBIAL CONSORTIUM

Занданова Т.Н. – канд. техн. наук, доц. каф. технологии переработки продуктов животноводства Якутской государственной сельскохозяйственной академии, г. Якутск.

E-mail: tuyana35@mail.ru

Гоголева П.А. – канд. с.-х. наук, доц. каф. технологии переработки продуктов животноводства Якутской государственной сельскохозяйственной академии, г. Якутск.

E-mail: imka-go@mail.ru

Zandanova T.N. – Cand. Techn. Sci., Assoc. Prof., Chair of Technology of Livestock Products Processing, Yakut State Agricultural Academy, Yakutsk.

E-mail: tuyana35@mail.ru

Gogoleva P.A. – Cand. Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Technology of Livestock Products Processing, Yakutsk.

E-mail: imka-go@mail.ru

Цель работы – изучение адгезивных свойств микробного консорциума, предназначенного для производства курунги и кумыса. Была исследована динамика формирования адгезивных свойств в процессе формирования микробного консорциума. Объектом исследования служил микробный консорциум, получаемый путем длительного культивирования комбинированной закваски, состоящей из кефирной грибковой закваски, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus* в соотношении 1:0,5:0,5 соответственно. Для исследований адгезивных свойств использовали экспресс-метод или развернутый метод по методике Брилиса. Количественный учет лактобактерий и дрожжей определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/см³) при высеве клеточных суспензий из соответствующих разведений на селективные питательные среды. В результате исследований установлено, что до начала автоселекционного процесса микрофлора кефирной грибковой закваски, *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* относятся к среднеадгезивным, а *Lactobacillus helveticus* проявляет низкоадгезивные свойства. Культивирование комбинированной закваски при pH от 4,7 до 3 ед. в течение 72 ч при 30 °С способствует формированию микробного консорциума, устойчивого к высокой концентрации молочной кислоты. Установлено, что сниже-

ние активной кислотности в процессе автоселекции вызывает повышение адгезивности микроорганизмов. Так, индекс адгезивности микробного консорциума после 72 ч культивирования составил 5,4 кл/эр, что значительно превосходит значения исходных компонентов. Адгезивные свойства являются одним из показателей эффективности действия пробиотических микроорганизмов, их способности создавать естественную иммобилизацию клеток и конкурировать с патогенными бактериями и гнилостными бактериями за рецепторы связывания эпителиальных клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения микробного консорциума для создания симбиотических бактериальных биологически активных добавок к пище.

Ключевые слова: адгезия, микробный консорциум, автоселекция, молочнокислые бактерии, кефирная грибковая закваска.

The research purpose was studying adhesive properties of microbial consortium intended for the production of kurunga and koumiss. The dynamics of formation of adhesive properties in the course of growing microbial consortium was investigated. As the object of the research microbial consortium received by long cultivation of combined ferment consisting of kefir fungal ferment, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus*

*helveticus in a ratio 1:0.5:0.5:0.5, respectively served. For the researches of adhesive properties an express method or the developed method by Brillis's technique was used. Quantitative accounting of lactobacilli and yeast was determined by the number of colony forming units (CFU / cm³) when seeding cellular suspensions from corresponding cultivations on selective nutrient media. As the result of the research, it was established that prior to autoselection process the microflora of kefir fungal ferment, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* belonged to medium-adhesive, and *Lactobacillus helveticus* exhibited low-adhesive properties. Cultivation of combined starter culture at pH from 4.7 to 3 units within 72 hours at 30 °C promoted the formation of microbial consortium steady against high concentration of lactic acid. It was established that the decrease in active acidity in the course of autoselection had caused the increase of microorganisms' adhesiveness. So, the index of adhesiveness of microbial consortium after 72 hours cultivation made 5.4 hl/er considerably surpassing the values of initial components. Adhesive properties are one of action indicators of efficiency of probiotic microorganisms, their abilities to create natural immobilization of cells and to compete with pathogenic bacteria and putrefactive bacteria for receptors of binding epithelial cells of a mucous membrane of a digestive tract. The obtained data testify to the possibility of using microbial consortium for making symbiotic bacterial biologically active food additives.*

Keywords: *adhesion, microbial consortium, autoselection, lactic acid bacteria, kefir fungal ferment.*

Введение. Молочнокислые бактерии широко применяются в фармацевтической и пищевой отрасли. Важнейшей функцией молочнокислых бактерий является синтез молочной кислоты, которая снижает pH среды, губительно действующей на развитие гнилостной и патогенной микрофлоры. Побочные продукты метаболизма, такие как экзополисахариды, пировиноградная кислота, диацетил и др., влияют на формирование консистенции, вкуса и аромата кисломолочных продуктов. Молочнокислые бактерии используются в медицине. Употребление пробиотиков нормализует работу желудочно-кишечного тракта, препятствует ее заселению

условно-патогенными микроорганизмами и улучшает состояние слизистой оболочки [1]

Для проявления пробиотических свойств молочнокислыми бактериями необходимо формирование ассоциаций с эпителиальными клетками ЖКТ хозяина. Основным процессом, обеспечивающим взаимоотношения макро- и микроорганизмов, является адгезия. Адгезивность бактериальных клеток – это один из механизмов защитного действия. Благодаря адгезии молочнокислые бактерии могут успешно конкурировать с энтеропатогенными бактериями за рецепторы связывания эпителиальных клеток слизистой оболочек [2, 3].

Известно, что спонтанно сформированные бактериальные биопленки характеризуются высокими адгезивными свойствами. Биопленки представляют естественную иммобилизацию клеток, обладающую колонизационной резистентностью [3–5].

Этими свойствами обладает спонтанно сформированная популяция микроорганизмов кисломолочных продуктов, таких как кефир, кумыс и кумыс. Микрофлора перечисленных кисломолочных продуктов представляет симбиоз термофильных и мезофильных лактобактерий, дрожжей, ацетобактерий, обладающих высокой антагонистической активностью к патогенной и гнилостной микрофлоре [6].

Нами разработан способ получения закваски, идентичной по составу естественной популяции микрофлоры кумыса и кумыса [7].

Цель работы. Исследование адгезивной активности полученного микробного консорциума.

Задачи: исследовать адгезивную активность исходных компонентов, применяемых для создания микробного консорциума; изучить механизм формирования адгезивных свойств микробного консорциума.

Объекты и методы исследования. В качестве объекта исследования использовали микробный консорциум, полученный путем длительного культивирования комбинированной закваски, состоящей из кефирной грибковой закваски, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* и *Lactobacillus helveticus* в соотношении 1:0,5:0,5:0,5 [6].

Для получения кефирной грибковой закваски и лабораторных заквасок *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* и *L. helveticus* использовали сухие

кефирные грибки и промышленные сухие закваски, произведенные ООО «Барнаульская биофабрика».

Адгезивные свойства микроорганизмов в зависимости от поставленных задач исследовали экспресс-методом или развернутым методом по методике Брилиса [8]. В качестве клеток макроорганизма использовали эритроциты человека. Поверхность эритроцитов близка поверхности эпителиальных клеток, на которых размещены рецепторы для адгезинов микробов. Исследуемые культуры выращивали в МПБ в течение 48 ч, полученную биомассу отделяли от культуральной среды центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. К осадку добавляли буферный раствор 0.1 М – раствор натрия фосфата.

ИАМ (индекс адгезивности микроорганизмов) вычисляли по формуле

$$\text{ИАМ} = \frac{\text{СПА}}{K} \cdot 100,$$

где СПА – средний показатель адгезии; K – коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе.

Количественный учет лактобактерий и дрожжей определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) при высеве клеточных суспензий из соответствующих разведений на селективные питательные среды.

Результаты исследования и их обсуждение. При исследовании адгезивных свойств исходных культур, применяемых для получения микробного консорциума, использовали экспресс-метод. Взвесь микроорганизмов и эритроцитов на предметном стекле термостатировали в течение 30 мин при $(42 \pm 2)^\circ\text{C}$ с термофильными молочнокислыми палочками и при $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ с кефирной грибковой закваской. Результаты исследования представлены в таблице.

Показатели адгезии исходных компонентов микробного консорциума

Культура	СПА, клеток	K, % эритроцитов	ИАМ, кл/эр
<i>L. acidophilus</i>	3,3	78	2,9
<i>L. bulgaricus</i>	1,73	72	2,4
<i>L. helveticus</i>	0,61	71	0,85
Кефирная грибковая закваска	3,01	81,6	3,68

Данные таблицы свидетельствуют, что исследуемые чистые культуры и кефирная грибковая закваска относятся к среднеадгезивным, а *L. helveticus* проявил низкие адгезивные свойства по отношению к эритроцитам.

Для приготовления кефирной грибковой закваски и инокулятов чистых культур использовали обезжиренное молоко по ГОСТ 52054-2003, не ниже первого сорта. Для приготовления кефирной грибковой закваски в пастеризованное при 85°C с выдержкой 15 мин, охлажденное до 20°C молоко вносили активизированные кефирные грибки в соотношении 1 г грибка на 50 мл молока. Для получения инокулятов чистые культуры вносили в стерилизованное при

100°C с выдержкой 5 мин, охлажденное до 42°C молоко. Культивирование проводили в отдельных для каждой закваски колбах при 20°C (кефирная грибковая закваска), при 42°C (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus* и *L. helveticus*).

Затем полученные кефирную грибковую закваску и закваски чистых культур *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* и *L. helveticus* смешивали в соотношении 1:0,5:0,5:0,5 и культивировали в течение 72 ч при 30°C .

Исследовали динамику популяции микрофлоры кефирной грибковой закваски и термофильных молочнокислых палочек в течение 72 ч термостатирования при 30°C .



Рис. 1. Динамика популяции микрофлоры кефирной закваски и термофильных лактобактерий в процессе автоселекции

Из данных рисунка 1 видно, что условия автоселекции приводят к уменьшению количества стрептококковой микрофлоры кефирной грибковой закваски и термофильных молочнокислых палочек. Вместе с тем благоприятно влияют на развитие мезофильных палочек и дрожжей, не сбраживающих лактозу. Основными факторами,

регулирующими формирование микробного консорциума процесса, являются температура и активная кислотность среды.

Далее были исследованы адгезивные свойства микробного консорциума в процессе автоселекции. Результаты исследования представлены на рисунке 2.

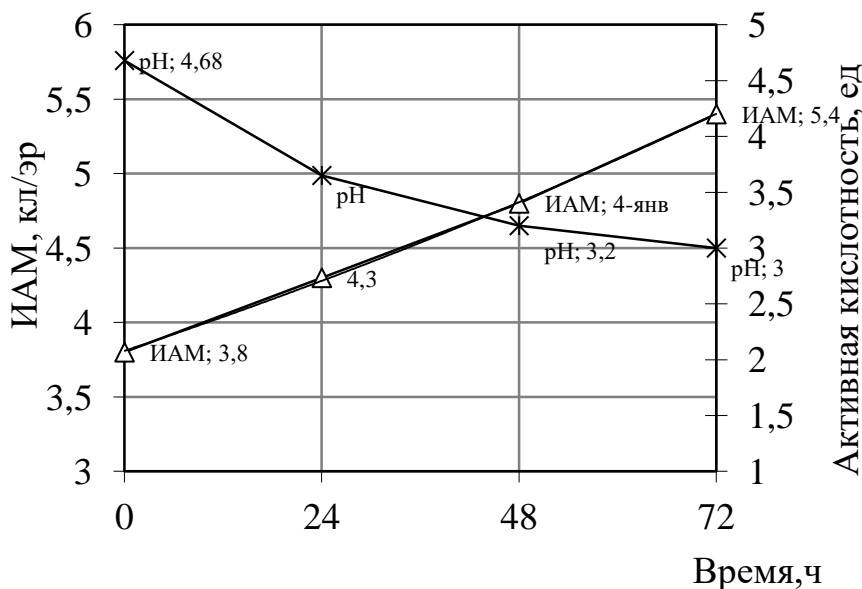


Рис. 2. Влияние рН среды на адгезивные свойства микробного консорциума

Из рисунка 2 видно, что снижение рН среды способствует увеличению количества микробных клеток, прикрепленных на одном эритроците. В начале автоселекции, в течение 24 ч, наблюдается резкое снижение активной кислотности среды от 4,7 до 3,6. Это связано с присутствием большого количества термофильных лак-

тобацилл ($8 \cdot 10^9$ клет/см³) в микрофлоре комбинированной закваски. Резкое снижение рН создает критические условия для развития многих видов микроорганизмов, входящих в состав комбинированной закваски. В течение 72 ч культивирования комбинированной закваски, состоящей из кефирной грибковой закваски, *L. acidophilus*,

L. bulgaricus и *L. helveticus* в соотношении 1:0,5:0,5:0,5 индекс адгезивности повышается до 5,4 кл/эр и превосходит показатели адгезивности исходных компонентов.

Выводы. На основании полученных результатов можно утверждать, что изменения адгезивности микроорганизмов зависят от условий культивирования. Этот факт также подтверждается литературными данными в области изучения микробной экологии человека и создания пробиотических препаратов. Одной из причин формирования микробных сообществ является способ их защиты от неблагоприятных внешних факторов. Действительно, микроорганизмы в сообществах более устойчивы к различным воздействиям: изменениям pH, температуры, лимитированию субстратами и др. В таких сообществах между видами конкуренции не существует [1–6]

Адгезивные свойства являются одним из показателей эффективности действия пробиотических микроорганизмов. Полученные результаты исследования свидетельствуют о возможности применения микробного консорциума для разработки уникальных симбиотических бактериальных биологически активных добавок к пище, предназначенных для нормализации микрофлоры ЖКТ.

Литература

1. Тяпкин А.Ю. [и др.]. Влияние различных факторов на образование биопленок молочнокислыми бактериями // Аграрный научный журнал. – 2017. – № 12 – С. 55–57.
2. Царькьянова И.Г. Изучение адгезивных свойств бактерий, перспективных для создания комплексного пробиотического препарата // Микробиологичний журнал. – 2005. – Т.67, № 2. – С. 88–95.
3. Ганнесен А.В. [и др.]. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. – 2015. – Т. 8, № 3. – С. 281–290.
4. Николаев Ю.А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.03. – М., 2011. – 50 с.
5. Анганова Е.В. [и др.]. Образование биопленок бактериями, выделенными от больных кишечными инфекциями из окружающей

- среды // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 12–18.
6. Занданова Т.Н., Гоголева П.А. Исследование биотехнологического потенциала микробного консорциума // Вестник ВСГУТУ. – 2013. – № 3. – С. 71–77.
7. Занданова Т.Н., Хамагаева И.С., Хурхесова Т.Е. Симбиотическая закваска для производства курунги // Пищевая промышленность. – 2009. – № 7. – С. 48–49
8. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. [и др.]. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4 – С. 210–213.

Literatura

1. Tjapkin A.Ju. [i dr.]. Vlijanie razlichnyh faktorov na obrazovanie bioplenok molochnokisljymi bakterijami // Agrarnyj nauchnyj zhurnal. – 2017. – № 12 – С. 55–57.
2. Car'k'janova I.G. Izuchenie adgezivnyh svojstv bakterij, perspektivnyh dlja sozdanija kompleksnogo probioticheskogo preparata // Mikrobiologichnij zhurnal. – 2005. – Т.67, № 2. – С. 88–95.
3. Gannesen A.V. [i dr.]. Reguljacija processa formirovanija bioplenok *Pseudomonas chlororaphis* v sisteme *in vitro* // Mikrobiologija. – 2015. – Т. 8, № 3. – С. 281–290.
4. Nikolaev Ju.A. Autoreguljacija stressovogo otveta mikroorganizmov: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk: 03.02.03. – М., 2011. – 50 s.
5. Anganova E.V. [i dr.]. Obrazovanie bioplenok bakterijami, vydelennymi ot bol'nyh kishechnymi infekcijami iz okruzhajushhej sredy // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. – 2015. – № 6. – С. 12–18.
6. Zandanova T.N., Gogoleva P.A. Issledovanie biotehnologicheskogo potenciala mikrobnogo konsorciuma // Vestnik VSGUTU. – 2013. – № 3. – С. 71–77.
7. Zandanova T.N., Hamagaeva I.S., Hurhesova T.E. Simbioticheskaja zakvaska dlja proizvodstva kurungi // Pishhevaja promyshlennost'. – 2009. – № 7. – С. 48–49
8. Brilis V.I., Brilene T.A., Lencner H.P. [i dr.]. Metodika izuchenija adgezivnogo processa mikroorganizmov // Laboratornoe delo. – 1986. – № 4 – С. 210–213.