

FTAMP:34.27.19

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТҰҢҒЫШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Д.К. КУЛЖАНОВА¹, Н.В. РУДАКОВ³

¹Абай атындағы Қазақ ұлттық педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

²Экостандарт.kz, Астана, Қазақстан

³Омбы табиғи – ошақты инфекциялар ҒЗИ, Омбы, Ресей

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

АДГЕЗИЯ ӘДІСІМЕН ПЕРСПЕКТИВТІ ПРОБИОТИКАЛЫҚ ШТАММДАРДЫ АЛУ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Түйін

Зерттеудің мақсаты перспективті пробиотикалық штаммдарды үй жағдайында дайындалған: бие сүті, қымыз, шұбат, қатық, айран сүтқышқылды тағамдардан бөліп алу.

Пробиотикалық микроорганизмдердің адгезивті қасиеті асқазан-ішек шырышты қабығының эпителий жасушаларын байланыстыратын рецепторлар үшін патогенді және шірік бактериялармен бәсекелесу қабілеттілігі тексерілді. Белсенді 16 сүтқышқылды бактериялардың ішінен жоғары және орташа көрсеткіштерге ие 12 штаммы іріктеліп алынды. Bruker MALDI-TOF BIOTYPER жүйесі арқылы идентификациялау барысында олар *Lactobacillus* туыстығына жататын 7 түрі анықталды: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* және *L. acidophilus*. Анықталған 7 штаммның адгезивті белсенділігі жоғары дәрежені көрсетті.

Зерттеу нәтижесінде алынған белсенді штаммдардан пробиотикалық консорциум *Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4 жиынтығы құрылды. Пробиотикалық консорциум алкогольді сусынмен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін түзету үшін пробиотикалық өнім жасау үшін таңдалып алынды.

Кілтті сөздер: сүтқышқылды бактериялар, лактобактериялар, пробиотиктер, адгезивті белсенділік, штаммдар.

Ғылыми - зерттеу жұмыстың басты мақсаты алкогольді сусындармен зақымданған ішкі ағза қуыс мүшелеріне оң әсер ететін, болашақта пробиотикалық өнім алуда қолданылатын пробиотикалық перспективті штаммдар алу болып табылады.

Пробиотиктердің қазіргі заманауи тұжырымдамасы соңғы онжылдықта қарқынды дами бастады [1].

Қазіргі уақытта Қазақстан халқы, бүкіл әлем сияқты, дұрыс тамақтануға және пайдалы өнімдерді қолдану, оның ішінде құрамында пробиотиктер бар өнімдерді тұтынуға мүдделі. Осыған байланысты жаңа пробиотикалық микроорганизмдерді іздеуге бағытталған зерттеулер өзекті болып отыр. Ашытылған функционалды тағамдарды дайындау үшін пробиотикалық штаммдар ретінде анықталған және сипатталған микроорганизмдердің таза, өміршең штаммдары қолданылады [2].

Бүгінгі таңда пробиотиктерге тірі микроорганизмдерді жатқызамыз. Яғни, адамның негізгі микрофлорасының өкілдері ретінде асқазан-ішек жолына жеткілікті мөлшерде енген кезде белсенділігін, өміршеңдігін сақтайды және денсаулығына оң әсер етеді. Пробиотиктер ретінде бифидобактериялардың әртүрлі түрлері қолданылады (*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*), лактобактериялар (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*) және басқалары микроорганизмдер (*Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*). Генетикалық әртүрліліктің арқасында олар бір-бірінен қасиеттері бойынша айтарлықтай ерекшеленеді. Бұл ғылыми-зерттеу жұмысы пробиотиктерді медицина, өндіріс саласында, ауылшаруашылығындағы

өзекті мәселелерді шешу үшін жаңа перспективті биологиялық препараттарды құру мәселелеріне арналған [3]. Бірақ біздің зерттеу жұмысымыздың алға қойған тапсырмалары бойынша лактобактерия тұқымдастарының бактерияларын зерттеу болып табылады.

Пробиотикалық бактериялар әртүрлі механизмдерді, яғни соның ішінде микробқа қарсы байланыстардың, патогендік бактериялардың адгезиясының төмендеуі арқылы энтеропатогендерге қарсы қорғаныс рөлін атқарады [4].

Пробиотиктердің әсер ету механизмдеріне патогендік микроорганизмдердің бәсекелестігін жою, өсуін тежеу және иммундық модуляция жатады. Олар ішек эпителийіне жабыса алатын бактериялар болып табылғандықтан, асқазан-ішек жолында колониялары едәуір белсенді түрде болады да, осылайша симбионттар арасында айқын артықшылықтарға ие екенін көрсетеді. Ас қорыту жүйесіне енетін көптеген бактериялар асқазан сөлі мен өт ортасында тіршілігін жояды да, осы факторларға төзімді микроорганизмдер ретінде пробиотиктер айқын ерекшеліктерін көрсетеді. Шырышты қабықтың эпителийіне еніп, олар бәсекелестік ерекшелік деп аталатын процестің нәтижесінде патогендік микроорганизмдердің өсуін тежеуге қабілетті болып саналады. Тарихи тұрғыдан алғанда, бұл механизм пробиотиктерді емдік әсерге көрсететін негізгі механизм ретінде қарастырады [5-7]. Пробиотиктер үшін негіз ретінде саналатын микроорганизмдер келесідей талаптарға сай болуы тиіс: 1) патогенді және улы емес; 2) асқазан-ішек жолдарындағы қышқылдар мен өт қышқылдарына төзімді болу; 3) ішектің эпителий жасушаларына бекітілуі; 4) ішек жолы колонизациясы арқылы тез көбеюге; 5) ішекте метаболизмдену; 6) ішек нормофлорасын тұрақтандыру; 7) лиофилизацияланған препараттарды алу процессінде өміршеңдігін сақтауы [8].

Соңғы жылдары құрамында пробиотикалық бактериялары бар ашытылған өнімдердің пайдалы әсерінің ғылыми дәлелдерін алу мақсатында көптеген зерттеулер жүргізілді [9]. Лактобактериялардың асқазан-ішек жолдарының шырышты қабығының бетіне жабысуы сәтті колонизациялануының бастапқы сатыларының бірі болып саналады [10]. Зертханадағы адгезивті қабілетін зерттеу әдісі инвазияның алдын алуда шешуші рөл атқарады және ішек қоздырғыштарының колонизациясы мен бактериялардың бәсекеге қабілеттілігін анықтайды [11]. Адгезивті белсенділік әдісі - бұл бактериялық жасуша қабырғасының беткі компоненттері мен жасуша бетінің комплементарлы құрылымы арасындағы өзара әрекеттесу [12]. Зертханалық адгезивті белсенділікті анықтау әдісі потенциалды механизммен байланысты экзополисахаридтер, липидтер, көмірсулар, мембранамен байланысқан рецепторлар және нуклеин қышқылдары ферменттер өндірісі болып табылады [13]. Адам денсаулығына оң әсер беретін, зертханалық штаммдар ішек қуысындағы жасушалар эпителийіне жабысу қабілеті жоғары болғандықтан, патогенді микроорганизмдерден қорғай алатын қабілеті де жоғарылай түседі [14-15]. Адгезивті белсенділік әдісі - микроорганизмдердің кез-келген тығыз субстраттарды, соның ішінде адам мен жануарлар ұлпаларын колонизациялауын қамтамасыз ететін күрделі көп компонентті процесс. Бүгінгі күнде адгезивті белсенділікті зерттеу үшін организм иесінің жасушаларын *in vitro* және *in vivo* әдістер арқылы зерттеу ұсынылған. Алайда *in vivo* әдістері зертханалық жануарларды қолдану арқылы штаммдардың көп мөлшерін зерттеу үшін өте көп уақытты қажет ететінін, сонымен қатар қымбат және жарамсыз екендігін дәлелдеді. Осыған байланысты бактериялардың адгезивті белсенділігін анықтауда *in vitro* әдісін қолдану барысында жасушалар ретінде жиі эритроциттер қолданылады. Ал қалыпты микрофлораның маңызды функцияларының бірі болып, оның қорғаныс қасиеттерін анықтайтын колонизацияға төзімділік пен адгезия болып табылады [16].

Микроорганизм микрофлорасының тұрақтылығы мен қорғаныс қасиеттері көбінесе адгезивті қасиетке байланысты екенін атап өткен жөн. Адгезияның арқасында резиденттік микрофлора колонизацияға төзімділік қасиетін жүзеге асырады. Яғни, биотоптардың бөгде микроорганизмдермен қоныстануына жол бермейді және инфекциялық агенттерден қорғаныс тосқауылын жасайды. Басқаша айтқанда, адгезияның молекулалық механизмдері патогендік формалар үшін де, нормофлора өкілдері үшін де әмбебап болып табылады.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Таза культураларды бөліп алу

Ғылыми зерттеу жұмысына 16 сүтқышқылды культуралар Алматы және Астана қалаларындағы үй жағдайындағы сүт өнімдерден, яғни бие сүті, қымыз, қатық, шұбаттан бөлініп алынды. Сүтқышқылды бактерияларды өсіру үшін арнайы HiMedia фирмасының MRS қоректік ортасы қолданылды. Яғни, бөліп алынған культураларды микроаэрофильді жағдайда 37°C температурадағы (redLINE RI-53, Германия) термостатқа 48 сағатқа инкубацияға қойылды. Осы зерттеу жұмысының мақсатында қолданылатын әдіс халықаралық стандартқа (ISO 8261, Сүт және сүт өнімдері. Микробиологиялық зерттеулер үшін сынамаларды, бастапқы суспензияларды және ондық сұйылтуларды дайындау бойынша жалпы нұсқаулар) сәйкес болып табылады.

Жалпы бөлініп алынған, таза культуралар Bruker MALDI-TOF Biotyper жүйесін қолдану арқылы идентификациядан өткізілді. Maldi-TOF MS үлгілерінің дайындалуы келесідей болды: балғын жеке бір колонияны MSP 96 жылтыратылған болат нысанаға (Bruker Daltonik) тікелей ауыстырып кептірді. Әрі қарай 1 мл қаныққан *a*-супано-4-hydroxycinnamic acid (HCA) matrix solution ерітіндісімен жабылып, 50% ацетонитрилде - 2.5% трифторуксусты қышқылында (Bruker Daltonik) және бөлме температурасында кептірілді [17].

Зерттеу мақсаты бойынша әрбір бөлініп алынған микроорганизмдерге адгезивті белсенділігін анықтау әдісі жүргізілді. Микроорганизмдердің адгезивті белсенділік әдісі-микроорганизмдердің қатты беттерде және сезімтал жасушаларда адсорбциялану қабілеті бар деген мағынаны білдіреді. Жалпы культуралардың адгезиясын *in vitro* жүйесінде адамның 0 (1) (Rh+) формализацияланған эритроциттерінде В.Брилис әдістемесі бойынша зерттелді. Микроскопиялық зерттеу бойынша кем дегенде 5 көру өрісінде кемінде 100 эритроциттерді санау жұмысы жүргізілді. Адгезияның орташа көрсеткіші (АОК) бойынша адгезия коэффициенті анықталды. АОК бір эритроциттің бетіне бекітілген микробтардың орташа саны бойынша анықталып, 5 көру өрісіндегі барлық эритроциттер (кем дегенде 50 эритроцит) саны саналды. Адгезияның 0-ден 1,0-ге дейінгі АОК – нөлге тең, ал 1,01 – 2,0 - төмен, 2,01-4,01 - орташа, 4,0-ден жоғары деп саналады. Қарастырылған эритроциттердің жалпы санынан эритроциттердің пайызы есептелді.

Адам эритроциттерінің суспензиясын дайындау.

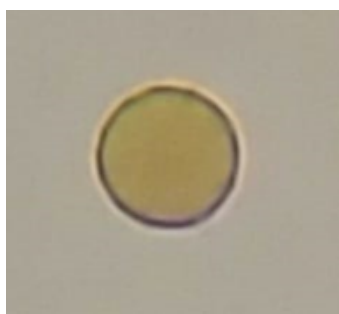
Адгезивті белсенділікті анықтау әдісін қолдану үшін (I) Rh+ топтағы (9 мл) адам қаны алынды. Алынған қанның салмағы 18,9609 г, ал дистилденген судың салмағы 18,9609 г етіп екі пробиркаға бірдей салмақта өлшеніп екі пробирка центрифуга ішіне қарама-қарсы қойылды. Тек эритроциттерді таза бөліп алу үшін 0,9% натрий хлорид ((NaCl) массалық үлесі ω (NaCl) \approx 0,9%) ерітіндісінің он есе көлемімен үш рет жуылып, 10 минут 1500 айналымда (Centrifuge CM-6M) центрифугалау әдісі арқылы сол ерітіндіде қайта суспензияланды. Қан үлгісінің үстінен сары су бөлініп, астыңғы бөлікте эритроциттер жиналды. Осылайша (I) Rh+ топтағы қан үлгісі тазаланып таза эритроцит алынды.

Адгезивті белсенділік әдісі бойынша 0,5 % эритроцит дайындалды. Ол үшін стерилденген 50 мл натрий хлорид ерітіндісі алынып, одан 0,250 мкл натрий хлорид ерітіндісін алып тастап, үстіне 250 мкл эритроцит құйып араластырылды. Дайын болған 0,5 % эритроцит ерітіндісімен штаммдарды енгізу жұмыстары жүргізілді.

Әрі қарай реакцияға GT204-0096D сериядағы U-тәрізді иммунологиялық реакцияларға арналған қақпағы бар 96 саңлаулы плашка қолданылды. Плашканың саңлауларына дайындалған тұтас суспензия енгізіліп отырды. Плашкаға 0,250 мкл натрий хлорид ерітіндісін толтырып шығып, әр саңлауға енгізетін штаммдардың атаулары белгіленіп алынды. Титрлеу арқылы плашкадан 1:4, 1:6, 1:8, 1:16 етіп 0,25 мкл алып тасталынып отырды. Әрі қарай барлық плашканың саңлауларына 0,5 % эритроцит 0,25 мкл-дан енгізілді. Дайын болған эритроцит ерітінділері араласқан штаммдары бар плашканы 37°C температураға термостатқа 3 сағатқа, әрі қарай қалыпты температурадағы 4°C тоназытқышқа 24 сағатқа қойылды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Бір тәуліктен соң плашкадағы штаммдардың 0,5% эритроцит ерітіндісімен әрекеттескен нәтижесі алынды. Зерттеу барысында адгезивті белсенділікті анықтау штаммдармен жұмыс істеу қиындықты тудырды. Себебі алынған нәтиже бойынша оларда 0,5% -дық эритроцит ерітіндісімен титірлегендегі эритроцит тұнбасы кейбір штаммдарда ағып кетіп отырды. Кейбір штаммдар (I) Rh+ топтағы қанмен араласқанда эритроцитке жабысып тұратындығын көрсетті. Сонымен қатар, зерттеуге PremiereE5 микроскопы арқылы микроскопиялық талдау жасалынды. Микроскопиялық талдауда эритроциттерді көру слайд әйнегі арқылы іске асырылды. Яғни, бұл әйнек белгілі бір қалыңдығы тегістелген жиегі бар 76 x 26 стандартты өлшемдегі шыны әйнек. Әдетте шынының беті тегіс және біркелкі қалыңдығы 1 мм болып келеді. Зерттеліп отырған үлгімен шыны арасында көпіршіктерінің болуына жол бермейді.



Сурет 1 – Боялмаған эритроцит



Сурет 2 – Сүтқышқылды бактериялар жабысқан эритроцит (S-106 штамы)

Сурет 1 - де боялмаған (I) Rh+ топ қанынан бөлініп алынған таза боялмаған эритроциттер берілген. Боялмаған эритроциттер зертханалық шыны әйнекке тамшуырман тамызу арқылы жасалып микроскопияда бақыланды. Ал сурет 2 – де эритроцитке сүтқышқылды бактериялар жабысқан (S-106 штамы) бейнесі берілген.

Яғни, S-106 штамы 0,5 % эритроцит ерітіндісімен әрекетке түскен кезде Фуксин ($C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$) бояуымен боялып микроскоп арқылы анықталды. Зерттеуге алынған 16 сүтқышқылды бактерияларды зерттей отырып, кесте 1-де жоғары, орташа, төмен жабысқақтық әсерлері бар штаммдар әртүрлі көрсеткіште анықталды. Және де зерттеу жұмыстың нәтижесін нақты анықтау мақсатында зерттеуге алынған барлық штаммдар адгезивті белсенділікке үш қайтара тексеріліп жасалынды.

Кесте 1 – Штаммдардың адгезивтілік көрсеткіштері

№	Штаммдардың атауы	Адгезияның орташа көрсеткіші (АОК)	Нәтижелері
1	2	3	4
1	<i>Lactobacillus paracasei</i> S- 612	4,0 ± 1,6	Жоғары
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> S- 106	4,0 ± 1,0	Жоғары
3	<i>Lactobacillus brevis</i> S- 149	2,1 ± 0,5	Орташа
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> S-74	0,6 ± 0,1	Белсенділігі жоқ
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> S- 414	4,0 ± 1,8	Жоғары
6	<i>Lactobacillus sakei</i> S-21	2,8 ± 1,5	Орташа
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	4,1 ± 1,6	Жоғары
8	<i>Lactobacillus lactis</i> S- 819	1,0 ± 1,0	Әлсіз
9	<i>Lactobacillus fermentum</i> П1-5	3,0 ± 1,0	Орташа
10	<i>Lactobacillus pentosus</i> S-805	1,3 ± 0,2	Әлсіз
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	4,5 ± 1,4	Жоғары

1- кесте жалғасы

1	2	3	4
12	<i>Lactobacillus brevis</i> S -2	4,2 ± 1,7	Жоғары
13	<i>Lactobacillus pentosus</i> S - 4	1,5 ± 0,25	Әлсіз
14	<i>Lactobacillus lactis</i> d-2	2,5 ± 1,0	Орташа
15	<i>Lactobacillus casei</i> d-3	2,0 ± 1,08	Орташа
16	<i>Lactobacillus fermentum</i> d-4	4,0 ± 1,4	Жоғары
Ескерту: АОК: 0-1,0 – белсенділігі жоқ; 1,0-2,0 -әлсіз; 2.01-4.01 -орташа; ≥ 4,0 - жоғары			

Штаммдардың адгезивтілігін зерттеу В. Брилис әдістемесі бойынша адамның 0 (1) (Rh+) тобының эритроциттерін *in vitro* арқылы жүргізілді. Нәтижесінде барлық штаммдар әртүрлі адгезивтілік қасиетін көрсетті. Бірақ, зерттеуге алынған 16 сүтқышқылды бактериялардың ішінен 7 штамм жоғары, 5 штамм орташа, 3 штамм әлсіз адгезивтілікті, ал 1 штамм белсенділігі жоқ екенін көрсетті. Барлық штаммдардың адгезияға көрсеткіштерінің мәндері 1 кестеде келтірілген.

Қорытынды

Зерттеу барысында алынған нәтижелерге сүйене отырып, сүтқышқылды өнімдерден бөлініп алынған штаммдардың адгезиясының өзгеруі бактериялардың өсу ортасына байланысты екендігі байқалады. Яғни, рН қышқылдық ортасының өзгеруі, температура және де т.б. байланысты. Және де бұл адамның микробты экологиясын зерттеу саласында зерттелген мәліметтермен, әдебиеттермен расталады. Адгезивтілік белсенділікті анықтау пробиотикалық штаммдардың әсерін бақылауда өте маңызды көрсеткіш болып табылады.

Зерттелген штаммдардың нәтижесінде алынған белсенді штаммдардан пробиотикалық консорциум (*Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) жиынтығы құрылды.

Зерттеу барысында алынған нәтижелерге сүйенсек, асқазан-ішек жолдары микрофлорасын және алкогольді сусынмен зақымдалған ішкі ағза қуыс мүшелерін қалыпқа келтіруде тағамға белсенді қоспа ретінде қолдануға болатын бірегей консорциумды әзірлеу үшін мүмкіндік береді.

Әдебиеттер:

1 Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 1965 Feb 12;147(3659):747-8 (doi: 10.1126/science.147.3659.747)

2 Латиф А.С., Сапарбекова А.А., Ахмедова З.Р., Калдыбекова Г.А., Кантуреева Г.О. *Saccharomyces cerevisiae* аборигенді штамдардың әртүрлі мәндеріне төзімділігіне және еріткіштерге деген микробты адгезиясын зерттеу. Микробиология және вирусология, №2 (41) 2023 (doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14)

3 Mercenier A., Pavan S., Pot B. Probiotics as biotherapeutic agent: present knowledge and future prospects. Curr Pharm Des. 2013;9(2):175-91 (doi: 10.2174/1381612033392224)

4 Каночкина М.С., Фоменко И.А., Чернуха И.М., Машенцева Н.Г. Методы селекции пробиотических микроорганизмов с высокими адгезивными свойствами. Клиническое питание метаболизм 2023. Том 4, (1): 19-28 (doi.org/10.17816/clinutr321901)

5 Julio Plaza-Diaz, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Mercedes Gil-Campos, and Angel Gil Mechanisms of Action of Probiotics/ 2019 Jan; 10(Suppl 1): S49–S66 (doi: 10.1093/advances/nmy063)

6 Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. Effect of *Lactobacillus salivarius* Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. Clin Nutr 2013 Dec;32(6):935-40 (doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.007)

7 De la Fuente-Nunez, Meneguetti BT, Franco OL, Lu TK. Neuromicrobiology: how microbes influence the brain. ACS Chem Neurosci 2018 Feb 21;9(2):141-150 (doi: 10.1021/acschemneuro.7b00373)

8 Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek WK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: an overview. Front Microbiol 2016 Apr 12;7:507 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00507)

9 Саубенова М.Г., Олейникова Е.А., Чижаева А.В., Алыбаева А.Ж., Айтжанова А.А., Амангелді А.А., Потороко И.Ю. Микробиота человека и болезни цивилизации: в поисках выхода. Микробиология және вирусология №3 (38) 2022 (doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01)

10 Keita Nishiyama., Makoto Sugiyama., Takao Mukai. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. Microorganisms 2016, 4, 34; (doi:10.3390/microorganisms4030034)

11 Du, Y., Li, H., Shao, J., Wu, T., Xu, W.L., Hu, X., Chen, J. Adhesion and colonization of the probiotic *Lactobacillus plantarum* HC-2 in the intestine of *Litopenaeus vannamei* are associated with bacterial surface proteins. Front. Microbiol. 2022 Apr 13;13:878874 (doi:10.3389/fmicb.2022.878874)

12 Alpe, D., Kuleasan, H. Determination of competition and adhesion abilities of lactic acid bacteria against gut pathogens in a whole-tissue model. Biosci. Microbiota. Food Health 2020, 39 (4), 250–25 (doi: 10.12938/bmfh.2020-033)

13 Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE 2012, 7, e33188 (doi.org/10.1371/journal.pone.0033188)

14 Wang R., Jiang L., Zhang M., Zhao L., Hao Y.L., Guo H.Y., Sang Y., Zhang H. and Ren F.Z. The adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires s-layer proteins. Sci. Rep., 2017, 7, 44029 (doi: 10.1038/srep44029)

15 Sun Z.L., Huang L.H., Kong J., Hu S.M., Zhang X.W. and Kong W.T. In vitro evaluation of *Lactobacillus crispatus* K313 and K243: high-adhesion activity and anti-inflammatory effect on *Salmonella* braenderup infected intestinal epithelial cell. Vet. Microbiol., 2012 Sep 14;159(1-2):212-20 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.043)

16 Масирбаева А.Д., Сайфудин, Б.К. Амирашева А.Ш., Жантлесова С.Д., Ерденбекова М.Б., Талапбек Ш., Байсариева А.М. Клиническое применение пробиотиков и пребиотиков. Микробиология және вирусология №1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)

17 Абиатаева Г.К., Сармурзина З.С., Бисенова Г.Н., Мусабаева Б.К., Тултабаева Т.Ч. Профилактикалық мақсаттағы сусындарды әзірлеуге арналған пробиотикалық штаммдардың сипаттамасы. Микробиология және вирусология №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)

Ж.А. ОРЫНБАЕВА^{1*}, З.Б. ТУНГУШБАЕВА¹, Н.Б. МОЛДАГУЛОВА²,
Д.К. КУЛЖАНОВА¹, Н.В. РУДАКОВ³

¹Казахский национальный педагогический университет им.Абая, Алматы, Казахстан

²Экостандарт.kz, Астана, Казахстан

³Омский НИИ природно-очаговых инфекций, Омск, Россия

*e-mail: jadi_astana@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МЕТОДОМ АДГЕЗИИ

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Аннотация

Целью исследования является выделение перспективных пробиотических штаммов из кисломолочных продуктов домашнего приготовления: кобыльего молока, кумыса, шубата, катыка, кефира.

Адгезивные свойства пробиотических микроорганизмов были проверены на способность слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта конкурировать с патогенными и гнилыми бактериями за рецепторы, связывающие эпителиальные клетки. Из 16 активных молочнокислых бактерий отобраны 12 штаммов с высокими и средними показателями. В ходе идентификации с помощью системы BIOTYPER Bruker MALDI-TOF были идентифицированы 7 видов, которые относятся к роду *Lactobacillus*: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* и *L. acidophilus*. 7 выявленных штаммов показали высокую степень адгезивной активности.

Из активных штаммов, полученных в результате исследования, был создан пробиотический консорциум *Lactobacillus paracasei* s-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophilus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2,

Lactobacillus fermentum d-4. Пробиотический консорциум был выбран для создания пробиотического продукта для коррекции полых органов внутреннего организма, поврежденных алкогольным напитком.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактобактерии, пробиотики, адгезивная активность, штаммы.

IRSTI: 34.27.19

Zh.A. ORYNBAYEVA^{1*}, Z.B. TUNGUSHBAEVA¹, N.B. MOLDAGULOVA²,
D.K. KULZHANOVA¹, N.V. RUDAKOV³

¹Kazakh National Pedagogical University named after Abai, Almaty, Kazakhstan

²Ecostandart.kz, Astana, Kazakhstan

³Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, Omsk, Russia

*To contact the author:jadi_astana@mail.ru

OBTAINING PROMISING PROBIOTIC STRAINS BY THE ADHESION METHOD

doi:10.53729/MV-AS.2023.03.14

Abstract

The aim of the study is to isolate promising probiotic strains from fermented dairy products of home-made: mare's milk, koumiss, shubat, katyk, kefir.

The adhesive properties of probiotic microorganisms were tested for the ability of the gastrointestinal mucosa to compete with pathogenic and rotten bacteria for receptors binding epithelial cells. 12 strains with high and average indicators were selected from 16 active lactic acid bacteria. During identification using the BIOTYPER Bruker MALDI-TOF system, 7 species that belong to the *Lactobacillus* family were identified: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*. 7 identified strains showed a high degree of adhesive activity.

The probiotic consortium *Lactobacillus paracasei s-612*, *Lactobacillus plantarum S-106*, *Lactobacillus plantarum S-414*, *Lactobacillus rhamnosus S-811*, *Lactobacillus acidophilus S-1*, *Lactobacillus brevis S-2*, *Lactobacillus fermentum d-4* was created from the active strains obtained as a result of the study. The probiotic Consortium was selected for creation of a probiotic product for the correction of hollow organs of the internal body damaged by an alcoholic beverage.

Keywords: lactic acid bacteria, lactobacilli, probiotics, adhesive activity, strains.

The main goal of the research work is to obtain promising strains of probiotics that have a positive effect on the internal organs of the cavity affected by alcoholic beverages, which will be used in the future in the production of probiotic products.

The current modern concept of probiotics began to develop rapidly in the last decade[1].

Currently, the people of Kazakhstan, like the rest of the world, are interested in proper nutrition and the use of healthy products, including the consumption of products containing probiotics. In this regard, research aimed at finding new probiotic microorganisms is becoming relevant. For the preparation of fermented functional foods, pure, viable strains of microorganisms identified and described as probiotic strains are used [2].

Today, we attribute live microorganisms to probiotics. That is, as representatives of the main human microflora, when entering the gastrointestinal tract in sufficient quantities, it retains activity, vitality and has a positive effect on health. Various types of bifidobacteria are used as probiotics (*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*), lactobacilli (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. gasseri*) and other microorganisms (*Lactococcus cremoris*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii*). Due to the genetic diversity, they differ significantly from each other in properties. This research work is devoted to the development of probiotics in the field of medicine, production, the creation of new promising biological drugs to solve pressing

problems in agriculture [3]. But according to the tasks set by our research work, it is the study of bacteria of the *Lactobacillus* family.

Probiotic bacteria play a protective role against enteropathogens by reducing various mechanisms, including antimicrobial bonds, adhesion of pathogenic bacteria [4].

The mechanisms of action of probiotics include the elimination of competition from pathogenic microorganisms, inhibition of growth, and immune modulation. Since they are bacteria that can attach to the intestinal epithelium, their colonies are quite active in the gastrointestinal tract and thus indicate that they have clear advantages between symbionts. Many bacteria that enter the digestive system destroy their life in the environment of gastric juice and bile, and probiotics show clear features as microorganisms resistant to these factors. Penetrating into the epithelium of the mucous membrane, they are considered capable of inhibiting the growth of pathogenic microorganisms as a result of a process called competitive specificity. Historically, this mechanism is considered as the main mechanism by which probiotics exhibit therapeutic effects [5-7]. Microorganisms that are considered the basis for probiotics must meet the following requirements: 1) non-pathogenic and toxic; 2) resistant to acids and bile acids in the gastrointestinal tract; 3) attachment to epithelial cells of the Intestine; 4) fast reproduction by colonization of the intestinal tract; 5) intestinal metabolization; 6) stabilization of intestinal normoflora; 7) preservation of viability in the process of obtaining lyophilized drugs [8].

In recent years, many studies have been conducted in order to obtain scientific evidence of the beneficial effect of fermented products containing probiotic bacteria [9]. The adhesion of lactobacilli to the surface of the gastrointestinal mucosa is considered one of the initial stages of successful colonization [10]. The method of studying adhesive capacity in the laboratory plays a key role in the Prevention of invasion and also determines the colonization of intestinal pathogens and the competitiveness of bacteria [11]. The adhesive activity method is the interaction between the surface components of the bacterial cell wall and the complementary structure of the cell surface [12]. The method for determining laboratory adhesive activity is the production of enzymes of exopolysaccharides, lipids, carbohydrates, membrane-bound receptors and nucleic acids associated with the potential mechanism [13]. As laboratory strains have a high ability to attach to the epithelium of cells in the intestinal cavity, which has a positive effect on human health, their ability to protect against pathogenic microorganisms is also increased [14-15]. The adhesive activity method is a complex multicomponent process that ensures that microorganisms colonize any dense substrates, including human and animal tissues. To date, it is proposed to study the cells of the host of an organism using in vitro and in vivo methods to study adhesive activity. However, in vivo methods have proven to be very time-consuming, as well as expensive and unsuitable, to study a large number of strains using laboratory animals. In this regard, in the process of using the in vitro method in determining the adhesive activity of bacteria, red blood cells are often used as cells. And one of the most important functions of normal microflora is resistance to colonization and adhesion, which determines its protective properties [16]

It should be noted that the stability and protective properties of the microflora of the microorganism largely depend on the adhesive property. Thanks to the adhesion, the resident microflora implements the property of resistance to colonization. That is, it prevents the settlement of biotopes by foreign microorganisms and creates a protective barrier against infectious agents. In other words, the molecular mechanisms of adhesion are universal for both pathogenic forms and representatives of normoflora.

Materials and methods of research

Separation of pure cultures

For research work, 16 lactic acid cultures were isolated from domestic dairy products in Almaty and Astana, namely mare's milk, kumys, katyk, shubat.

For the cultivation of lactic acid bacteria, a special MRS nutrient medium from HiMedia was used. That is, the extracted cultures were incubated for 48 hours on a thermostat at a temperature of 37°C (redLINE RI-53, Germany) in microaerophilic conditions. The method used for the

purpose of this research work is based on the international standard (ISO 8261, milk and dairy products. General guidelines for the preparation of samples, primary suspensions and decimal dilutions for microbiological research).

Total isolated, pure cultures were identified using the Bruker MALDI-TOF biotype system. The preparation of the Maldi-TOF MS samples was as follows: fresh dried an individual single colony with direct transfer to a polished steel target MSP 96 (Bruker Daltonik). Next, 1 ml of saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCA) was covered with matrix solution and dried in 50% acetonitrile -2.5% trifluoroxusic acid (Bruker Daltonik) and at room temperature [17].

For the purpose of the study, a method was carried out to determine the adhesive activity of each isolated microorganism. The method of adhesive activity of microorganisms means that microorganisms have the ability to adsorb on hard surfaces and sensitive cells. The adhesion of general cultures in 0 (1) (Rh+) formalinized human erythrocytes in the in vitro system was studied by the method of V. Brilis. According to a microscopic study, work was carried out to count at least 100 red blood cells in at least 5 visual fields. The adhesion coefficient according to the average adhesion indicator (AOC) is determined. AOC was determined by the average number of microbes attached to the surface of one erythrocyte, and the number of all erythrocytes (at least 50 erythrocytes) in the 5 field of view was counted. AOK of adhesion from 0 to 1.0 is considered zero, and 1.01 -2.0 is considered low, 2.01 - 4.01 is considered medium, and 4.0 is considered high. From the total number of red blood cells considered, the percentage of red blood cells was calculated.

Preparation of a suspension of human erythrocytes.

To use the method for determining adhesive activity, human blood of the (I) Rh+ Group (9 ml) was taken. The resulting blood weighed 18.9609 G, and the distilled water weighed 18.9609 G, and the two test tubes were placed opposite each other in a centrifuge, weighing the same weight. For pure red blood cells only, 0.9% Sodium Chloride ((NaCl) mass fraction ω (NaCl) \approx 0.9%) was washed three times with ten times the volume of the solution and re-suspended in the same solution by centrifugation method for 10 minutes at 1500 revolutions (Centrifuge CM-6m). Yellow water was released over the blood sample and red blood cells were collected in the underside. Thus, a blood sample of the (I) Rh+ group was cleaned and a pure erythrocyte was obtained.

According to the adhesive activity method, 0.5% erythrocyte was prepared. To do this, 50 ml of sterilized sodium chloride solution was taken, 0.250 ml of sodium chloride solution was removed from it and mixed with 250 ml of erythrocyte. Work was carried out on the introduction of strains with a prepared 0.5% erythrocyte solution.

Further, a 204-0096d Series U-shaped plate with a cap for immunological reactions was used for the reaction. A whole prepared suspension was inserted into the holes of the plashka. Fill the plate with 0.250 microns of sodium chloride solution and mark the names of the strains that are introduced into each hole. From the plashka by titration 1:4, 1:6, 1:8, 1:16 0.25 μ L was removed. Further, 0.5% erythrocytes of 0.25 μ L were injected into all the pores of the plashka. The prepared sheet with strains mixed with erythrocyte Solutions was placed in the thermostat at a temperature of 37 ° C for 3 hours, and then in the refrigerator at a normal temperature of 4 ° C for 24 hours.

Results and discussion

After a day, the results of 0.5% erythrocyte solution interaction of strains in the plashka were obtained. In the course of the study, the determination of adhesive activity caused difficulties in working with strains. Because according to the results obtained, erythrocyte sedimentation on titration with 0.5% erythrocyte solution was leaked in some strains. Some strains (I) have shown that Rh+ sticks to the erythrocyte when mixed with Group blood. In addition, the study was subjected to microscopic analysis using the Pgemiege5 microscope. In microscopic analysis, the vision of red blood cells was realized through a slide glass. That is, this glass is a glass of standard size 76 x 26 with a flattened edge of a certain thickness. Usually the glass surface is smooth and

has a uniform thickness of 1 mm. Prevents the presence of bubbles between the glass and the sample under study.

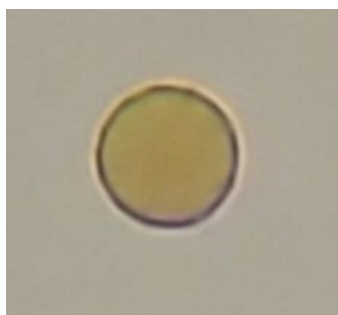


Figure 1 - unpainted erythrocyte



Figure 2 – Erythrocyte attached to lactic acid bacteria (S-106 strain)

Figure 1 shows pure unpainted red blood cells isolated from the blood of the unpainted (I) RH+ group. Unpainted red blood cells were made by dripping with a pipette into a laboratory glass and observed under microscopy. And Figure 2 shows an image of lactic acid bacteria attached to the erythrocyte (strain S-106).

That is, the S-106 strain was detected under a microscope by staining with Fuchsin (C₂₀H₁₉N₃•HCL) when exposed to 0.5% erythrocyte solution. By examining 16 lactic acid bacteria taken for the study, strains with high, medium, low stickiness effects were identified in Table 1 in a different indicator. In order to accurately determine the results of the study, all strains taken for the study were tested for adhesive activity in three rounds.

Table 1-indicators of adhesion of strains

№	Name of strains	Average adhesion index (AAI)	Results
1	<i>Lactobacillusparacasei</i> S- 612	4,0 ± 1,6	high
2	<i>Lactobacillusplantarum</i> S- 106	4,0 ± 1,0	high
3	<i>Lactobacillus brevis</i> S- 149	2,1 ± 0,5	moderate
4	<i>Lactobacillusplantarum</i> S-74	0,6± 0,1	no activity
5	<i>Lactobacillusplantarum</i> S- 414	4,0 ± 1,8	high
6	<i>Lactobacillussakei</i> S-21	2,8 ± 1,5	moderate
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> S-811	4,1 ± 1,6	high
8	<i>Lactobacilluslactis</i> S- 819	1,0 ± 1,0	weak
9	<i>Lactobacillusfermentum</i> III-5	3,0 ± 1,0	moderate
10	<i>Lactobacilluspentosus</i> S-805	1,3 ± 0,2	weak
11	<i>Lactobacillus acidophilus</i> S-1	4,5 ± 1,4	high
12	<i>Lactobacillusbrevis</i> S -2	4,2 ± 1,7	high
13	<i>Lactobacillus pentosus</i> S - 4	1,5 ± 0,25	weak
14	<i>Lactobacilluslactis</i> d-2	2,5 ± 1,0	moderate
15	<i>Lactobacilluscaseid</i> -3	2,0± 1,08	moderate
16	<i>Lactobacillusfermentum</i> d-4	4,0 ± 1,4	high

Note: AAI: 0-1.0 –no activity; 1.0-2.0-weak; 2.01 - 4.01-moderate; ≥ 4.0 - high.

The study of the adhesion of strains was carried out in vitro using erythrocytes of Group 0 (1) (Rh+) of a person according to the methodology of V. Brilis. As a result, all strains showed different adhesion properties. But, out of 16 lactic acid bacteria taken in the Study, 7 strains showed high, 5 strains showed moderate, 3 strains showed weak adhesion, and 1 strain showed no activity. The values of the adhesion indicators of all strains are presented in Table 1.

Conclusion

Based on the results obtained during the study, it is observed that the change in adhesion of strains isolated from lactic acid products depends on the growth environment of bacteria. That is, the pH depends on the change in the acidic environment, temperature, etc. And this is confirmed by the data and literature studied in the field of studying the microbial ecology of humans. Determination of adhesion activity is a very important indicator in the control of exposure to probiotic strains.

From the active strains obtained as a result of the studied strains, A Probiotic consortium (*Lactobacillus paracasei* S-612, *Lactobacillus plantarum* S-106, *Lactobacillus plantarum* S-414, *Lactobacillus rhamnosus* S-811, *Lactobacillus acidophylus* S-1, *Lactobacillus brevis* S-2, *Lactobacillus fermentum* d-4) was formed.

Based on the results obtained during the study, it is possible to develop a unique consortium that can be used as an active additive to food in the normalization of the microflora of the gastrointestinal tract and the internal organs of the cavity damaged by an alcoholic drink.

References:

- 1 Lilly D.M., Stillshhell R.H. Probiotics: Groshhth promoting factors produced by microorganisms. Science. 1965 Feb 12;147(3659):747-8(doi: 10.1126/science.147.3659.747)
- 2 Latif A.S., Saparbekova A.A., Ahmedova Z.R., Kaldybekova G., Kantureeva G.O. Saccharomyces cerevisiae aborigendi shtamdarkyң әrtырli мәnderine төзимdiligine zhәne erikishterge degen mikroby adgeziyasyn zertteu. Mikrobiologija zhәne virusologija, №2 (41) 2023 (doi: 10.53729/MV-AS.2023. 02.14)
- 3 Mercenier A., Pavan S., Pot B. Probiotics as biotherapeutic agent: present khushhledge and future prospects. CurrPharmDes. 2013; 9(2):175-91(doi: 10.2174/1381612033392224)
- 4 Kanochkina M.S., Fomenko I.A., Chernuha I.M., Mashenceva N.G. Metody selekcii probioticheskikh mikroorganizmov s vysokimi adgezivnymi svojstvami. Klinicheskoe pitanie i metabolizm 2023. Tom 4, (1): 19-28 (doi.org/10.17816/clinutr321901)
- 5 Julio Plaza-Diaz, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Mercedes Gil-Campos, and Angel Gil Mechanisms of Action of Probiotics/ 2019 Jan; 10(Suppl 1): S49–S66 (doi: 10.1093/advances/nmy063)
- 6 Larsen N, Vogensen FK, Gøbel RJ, Michaelsen KF, Forssten SD, Lahtinen SJ, Jakobsen M. Effect of Lactobacillus salivarius Ls-33 on fecal microbiota in obese adolescents. Clin Nutr 2013 Dec;32(6):935-40 (doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.007)
- 7 De la Fuente-Nunez, Meneguetti BT, Franco OL, Lu TK. Neuromicrobiology: hosh microbes influence the brain. ACS Chem Neurosci 2018 Feb 21;9(2):141-150 (doi: 10.1021/acschemneuro.7b00373)
- 8 Rather IA, Bajpai VK, Kumar S, Lim J, Paek ShhK, Park YH. Probiotics and atopic dermatitis: an overvieshh. Front Microbiol 2016 Apr 12;7:507 (doi: 10.3389/fmicb.2016.00507)
- 9 Saubenova M.G., Olejnikova E.A., Chizhaeva A.V., Alybaeva A.Zh., Ajtzhanova A.A., Amangeldi A.A., Potoroko I.Ju. Mikrobiota cheloveka i bolezni civilizacii: vpoiskah vyhoda. Mikrobiologija zhәne virusologija №3 (38) 2022 (doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01)
- 10 Keita Nishijama., Makoto Sugijama., Takao Mukai. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. Microorganisms 2016, 4, 34; (doi:10.3390/microorganisms4030034)
- 11 Du, Y., Li, H., Shao, J., Shhu, T., Hu, Shh.L., Hu, H., Chen, J. Adhesion and colonization of the probiotic Lactobacillus plantarum HC-2in the intestine of Litopenaeus vannamei are associated shhith bacterial surface proteins. Front. Microbiol.2022 Apr 13;13:878874(doi:10.3389/fmicb.2022.878874)
- 12 Alpe, D., Kuleasan, H. Determination of competition and adhesion abilities of lactic acid bacteria against gut pathogens in ashhhole-tissue model. Biosci.Microbiota. Food Health 2020, 39 (4), 250–25 (doi: 10.12938/bmfh.2020-033)
- 13 Vásjauetz, A., Forsgren, E., Fries, I., Pahton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., Olofsson, T.C. Symbionts as major modulators of insecthealth: Lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE 2012,7, e33188 (doi.org/10.1371/journal.pone.0033188)
- 14 Shhang R., Jiang. L., Zhang M., Zhao L., Hao Y.L., Guo H.Y., Sang Y., Zhang H. and Ren F.Z. The adhesion of Lactobacillus salivarius REN to a human intestinal epithelial cell line rejauires s-layerproteins, Sci. Rep., 2017,7, 44029 (doi: 10.1038/srep44029)
- 15 Sun Z.L., Huang L.H., Kong J., Hu S.M., Zhang H.Shh. and Kong Shh.T. In vitro evaluation of Lactobacillus crispatus K313 and K243: high-adhesion activity and anti-inflammatory effect on Salmonella

braenderup infected intestinal epithelial cell, *Vet. Microbiol.*, 2012 Sep 14;159(1-2):212-20 (doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.043)

16 Masirbaeva A.D., Sajfudin, B.K. Amirasheva A.Sh., Zhantlesova S.D., Erdenbekova M.B., Talapbek Sh., Bajsarieva A.M. Klinicheskoe primeneniye probiotikov i prebiotikov. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya* №1 (40) 2023 (doi:10.53729/MV-AS.2023.01.04)

17 Abitaeva G.K., Sarmurzina Z.S., Bisenova G.N., Musabaeva B.K., Tultabaeva T.Ch. Profilaktikalық мақсаттағы susyndardy əzirleuge arналған probiotikalық shtammdardың sipattamasy. *Mikrobiologiya zhəne virusologiya* №4 (39) 2022 (doi: 10.53729/MV-AS.2022.04.11)