

МРНТИ: 34.27.51

А.К. САДАНОВ, Н.Н. ГАВРИЛОВА, И.А. РАТНИКОВА\*, С.Э. ОРАЗЫМБЕТ,  
Е.Ж. ШОРАБАЕВ, Ж.Т. МУСАБЕКОВ, Р.Ж. КАПТАГАЙ, Л.Е. ПРОТАСЮК,  
Л.А. КОШЕЛЕВА, С.Б. ДЖАЙЛЯУОВА

Промышленная микробиология, Алматы, Казахстан

\*e-mail: iratnikova@list.ru

## АССОЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.07

### Аннотация

При изучении антагонистической активности двух пробиотических ассоциаций выявлено, что ассоциация со штаммами *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36, превосходит в жидком и сухом виде известную ассоциацию *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 по спектру антимикробного действия и величине антагонистической активности, которая может быть использована для создания эффективных лечебных пробиотических препаратов.

**Ключевые слова:** ассоциация бактерий, пробиотик, антагонизм, кишечные инфекции.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) – одна из актуальных проблем здравоохранения всех стран [1], в том числе и Казахстана. Так, в Казахстане среди зарегистрированных инфекционных заболеваний в январе-декабре 2019 года, на втором месте после острых инфекций дыхательных путей стояли ОКИ – 22997 случаев [2]. Повсеместная распространенность, высокая частота развития среднетяжелых и тяжелых форм, осложнений определяют необходимость поиска путей оптимизации тактики лечения данной группы заболеваний.

Сложность лечения инфекционных заболеваний связана с массовым нерациональным использованием антибиотиков и химиотерапевтических препаратов, приведшему к развитию множественной лекарственной устойчивости патогенов [3]. Кроме того, применение антибиотиков нередко сопровождается изменением качественного и количественного состава кишечной микробиоты. Показано, что нарушения микробиоты (дисбиоз) предрасполагают к развитию различных болезней желудочно-кишечного тракта, атопии, ожирения, метаболического синдрома, сахарного диабета, ревматоидного артрита, злокачественных новообразований и, возможно, других патологий [4-7]. В связи с этим, в последнее время в мире для лечения кишечных инфекций все чаще вместо антибиотиков рекомендуют использовать пробиотики на основе микроорганизмов - симбионтов желудочно-кишечного тракта.

В настоящее время фармакологические пробиотические препараты считаются наиболее адекватными и эффективными средствами для поддержания и коррекции микробиологии человека на оптимальном уровне.

Пробиотики относятся к группе медицинских иммунобиологических препаратов на основе живых бактерий, антагонистически активных в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов - возбудителей различных инфекционных заболеваний и не оказывающих отрицательного влияния на представителей нормальной микрофлоры человека. Чаще всего, пробиотические препараты используют для профилактики и лечения острых кишечных инфекций и коррекции дисбиотических состояний. Подобная терапия сопровождается, как правило, позитивными сдвигами в системе неспецифической иммунологической защиты организма и приводит к повышению сопротивляемости организма к воздействию неблагоприятных факторов.

В настоящее время на рынке появилось много зарубежных пробиотических препаратов на основе живых микроорганизмов. В рейтинг лучших пробиотических средств, нормализующих деятельность желудочно-кишечного тракта, способствующих восстановлению иммунитета, улучшающих обменные процессы, вошли: Бифидумбактерин, Бифидумбактерин Форте, Лактобактерин, Пробифор, Аципол (Россия), Энтерол (Франция), Бифиформ (Дания) [8]. Вместе с тем, известные лечебно-профилактические пробиотики против кишечных инфекций не всегда эффективны [9, 10]. Причиной этого является недостаточно широкий антимикробный спектр действия, не подбираются антагонисты к конкретным возбудителям заболеваний.

Одним из основных критериев отбора микроорганизмов в состав пробиотиков является выраженность спектра их антагонистической активности в отношении различных возбудителей инфекционных заболеваний.

Исходя из выше перечисленного, целью настоящего исследования был отбор наиболее активной пробиотической ассоциации по антагонистической активности для создания пробиотика, активного в отношении возбудителей кишечных и внекишечных инфекций. В качестве контроля был взят препарат Плантафермин на основе штаммов *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2, показавший эффективность в отношении кишечных инфекций человека [11, 12].

### Материал и методы исследований

Ассоциация бактерий *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 отобрана из лабораторной коллекции молочнокислых бактерий с высокой антимикробной и ферментативной активностью, выделенных от здоровых людей.

Штамм *L. fermentum* 30 получен из популяции сублимационно высушенной культуры *L. fermentum* 29, выделенной из кишечника здорового человека. Представлен грамположительными, аспорогенными, неподвижными, палочками размером 0,5-0,7x1,0-3,0 мкм с тупыми концами, чаще одиночными, но встречаются короткие цепочки. При росте на плотной питательной среде образует плоские, круглые, шероховатые колонии. При росте в жидкой питательной среде образуется равномерная муть. Сбраживает галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, мелибиозу, раффинозу, сахарозу. Целлобиозу, маннит, рамнозу, ксилозу, сорбит не использует или ферментирует слабо. Восстанавливает нитраты, из аргинина образует аммиак. Слабо подкисляет молоко. Гидролизует крахмал. Оптимальный рост при 37°C, хорошо растет при 45°C, при 15°C рост ограничен. Использует органические источники азота: пептон, дрожжевой автолизат, мясной экстракт, кукурузный экстракт, экстракт солодовых ростков. H<sub>2</sub>S и индол не образует. Не обладает каталазной активностью. Непатогенный. Обладает высокой антимикробной активностью с широким спектром действия и повышенной устойчивостью к высушиванию.

Штамм *L. cellobiosus* 36 выделен из популяции сублимационно высушенной культуры *L. cellobiosus* 35. Представляет собой палочки с закругленными концами переменных размеров: 0,5-0,7x1,5-5,5 мкм, неподвижные, аспорогенные, грамположительные. Палочки расположены одиночно, в коротких цепочках (по 3-5 клеток), иногда в более длинных цепочках. При росте в жидкой питательной среде образуется равномерная взвесь с прозрачным кольцом в верхнем слое. Поверхностные колонии на плотной питательной среде плоские, ризоидные, глубинные - светло-желтые, чечевидные. Ферментирует арабинозу, рибозу, целлобиозу, галактозу, глюкозу, глюконат, раффинозу, мальтозу, мелибиозу, сахарозу. Слабая реакция на лактозу, маннозу, ксилозу. Образует CO<sub>2</sub> при сбраживании глюкозы и глюконата. Не сбраживает маннит, рамнозу. Из аргинина образует аммиак. Молоко в течение двух суток не сквашивает. Растет при 15°C и не растет при 45°C. Оптимальная для роста температура 35°C. Использует органические источники азота: пептон, дрожжевой автолизат или экстракт, мясной экстракт. Индол и H<sub>2</sub>S не образует. Не патогенный. Обладает высокой антимикробной активностью с широким спектром действия.

Для исследований ассоциации культур *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2, а также *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 выращивали каждую отдельно в течение 24 ч при 35°С в питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза – 15,0; дрожжевой экстракт – 5,0; мясной экстракт – 5,0; пептон – 10,0; аммоний лимоннокислый – 2,0; натрий уксуснокислый – 2,0; калий фосфорнокислый 1-замещенный – 2,0; натрий фосфорнокислый 2-замещенный – 2,0; магний сернокислый – 0,2; марганец сернокислый – 0,05; кобальт хлористый – 0,01; рН – 6,5-7,0; вода питьевая – до 1л.

Для сублимационного высушивания в жидкие ассоциации добавляли защитные компоненты: 7% сахарозы и 1,5% желатина + 7% СОМ. После этого препараты разливали в стерильные пенициллиновые флаконы по 5 мл и высушивали в сублимационной сушилке Liobeta-35. Нарботанные опытные партии сухих препаратов заложены на хранение в холодильнике. при температуре от 2 до 8°С.

Определение антагонистической активности ассоциаций проводили методом диффузии в агар в отношении тест-культур *Staphilococcus aureus* MRSA 9, *Staphilococcus aureus* MRSA 3316, *Shigella flexneri* 11, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumonia* 444, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* 835, *Pseudomonas aeruginosa* 342, *Proteus sp.*, *Mycobacterium B<sub>5</sub>*, *Candida albicans* проводили по диаметру зон подавления их роста [13].

Численность микроорганизмов в сухих препаратах устанавливали путем ряда последовательных разведений в стерильной водопроводной воде и посева их в агаризованную питательную среду MRS с последующим подсчетом выросших колоний.

Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [14]. Статистическую достоверность полученных результатов определяли по t-критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Результаты исследований антагонистической активности исследуемых ассоциаций после их культивирования в течение 24 ч в жидкой питательной среде представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика антагонистической активности различных ассоциаций бактерий

| Тест-организмы                     | Зоны подавления роста тест-организмов, мм         |   |
|------------------------------------|---|---|
|                                    | Варианты ассоциаций бактерий                      |   |
|                                    | <i>L. fermentum</i> 27 + <i>L. plantarum</i> 2в/2 | <i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36 |
| 1                                  | 2   | 3   |
| <i>E. coli</i>                     | 15,5±0,7  | 22,0±0,3  |
| <i>S. gallinarum</i>               | 14,0±0,9  | 21,0±0,4  |
| <i>Sh. flexneri</i> 11             | 0   | 17,0±0,5  |
| <i>S. aureus</i> 3316              | 14,0±0,5  | 17,0±0,5  |
| <i>S. aureus</i> 9                 | 17,5±0,5  | 25,0±0,4  |
| <i>K. pneumoniae</i> 444           | 18,0±0,3  | 26,0±0,5  |
| <i>C. albicans</i>                 | 16,0±0,2  | 25,0±0,3  |
| <i>P. multocida</i>                | 18,0±0,3  | 25,0±0,5  |
| <i>P. aeruginosa</i> 342           | 13,0±0,8  | 26,0±0,7  |
| <i>P. aeruginosa</i> 835           | 9,0± 0,2  | 22,0±0,6  |
| <i>Acinetobacter sp.</i> 1132      | 15,0± 0,5   | 26,0±0,5  |
| <i>Acinetobactersp.</i> 1522       | 0   | 16,0±0,5  |
| <i>Proteus sp.</i>                 | 14,0±0,5  | 18,0±0,6  |
| <i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i> | 20,0±1,0  | 28,0±0,9  |

Как видно из представленной таблицы, ассоциация из штаммов *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 обладает более широким спектром действия и более высокой антимикробной активностью по сравнению с ассоциацией *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2В/2. Так, в отличие от противопоставляемой ассоциации, у нее выявлена антагонистическая активность в отношении *Acinetobacter sp.* 1522 и *Shigella flexneri* 11, а также отмечено повышение антагонизма в отношении всех исследованных тест-культур, в особенности к *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 и *Mycobacterium B5*.

Титр бактерий исследуемых ассоциаций определяли в сублимационно высушенных препаратах исходных и после их хранения в течение 4, 7 и 12 месяцев в холодильнике (таблица 2).

Таблица 2 - Содержание жизнеспособных клеток пробиотических бактерий в сублимационно высушенных препаратах и после их хранения в холодильнике

| Ассоциации  | Титр жидкой культуры, млрд КОЕ/мл | Содержание бактериальных клеток в сухих препаратах, млрд КОЕ/г |                         |                          |                           |
|---|-----------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   |                                   | Исходные после высушивания                                     | Через 4 месяца хранения | Через 7 месяцев хранения | Через 12 месяцев хранения |
| <i>L. fermentum</i> 27 и <i>L. plantarum</i> 2В/2 | 6,5±0,3×10 <sup>9</sup>           | 3,8±0,3×10 <sup>9</sup>  | 3,0±0,3×10 <sup>9</sup> | 3,0±0,2×10 <sup>9</sup>  | 2,0±0,2×10 <sup>9</sup>   |
| <i>L. fermentum</i> 30 и <i>L. cellobiosus</i> 36 | 7,8±0,4×10 <sup>9</sup>           | 6,7±0,3×10 <sup>9</sup>  | 6,0±0,3×10 <sup>9</sup> | 6,0±0,3×10 <sup>9</sup>  | 5,6±0,2×10 <sup>9</sup>   |

По результатам таблицы видно, что в сухих препаратах в течение срока наблюдений (12 месяцев) хорошо сохранилась жизнеспособность пробиотических бактерий. Более высокий титр бактерий отмечен у ассоциации., состоящей из бактерий *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36.

Изучена также антагонистическая активность пробиотических препаратов после их сублимационного высушивания и хранения (таблица 3).

Таблица 3 - Антагонистическая активность высушенных ассоциаций исходных и после 4,7 и 12 месяцев хранения

| Ассоциация  | Тест-культуры                 | Зоны подавления роста тест-культур, мм |                         |                          |                           |
|---|-------------------------------|--|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   |                               | Исходные после высушивания             | Через 4 месяца хранения | Через 7 месяцев хранения | Через 12 месяцев хранения |
| 1   | 2                             | 3                                      | 4                       | 5                        | 6                         |
| <i>L. fermentum</i> 27 и <i>L. plantarum</i> 2В/2 | <i>E. coli</i>                | 13,0±0,5                               | 12,5±0,4                | 12,0±0,5                 | 11,5±0,5                  |
|   | <i>S. gallinarum</i>          | 10,5±0,2                               | 9,5±0,4                 | 9,0±0,4                  | 9,0±0,3                   |
|   | <i>S. aureus</i> 3316         | 12,5±0,3                               | 11,0±0,5                | 11,0±0,7                 | 10,5±0,6                  |
|   | <i>S. aureus</i> 9            | 14,0±0,5                               | 12,5±0,6                | 12,0±0,3                 | 12,0±0,6                  |
|   | <i>K. pneumoniae</i> 444      | 15,5±0,6                               | 13,5±0,3                | 13,0±0,5                 | 12,6±0,4                  |
|   | <i>C. albicans</i>            | 13,0±0,3                               | 12,0±0,5                | 12,0±0,6                 | 11,5±0,3                  |
|   | <i>P. multocida</i>           | 15,0±0,5                               | 14,0±0,2                | 13,0±0,5                 | 12,0±0,4                  |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 342      | 11,0±0,4                               | 10,5±0,3                | 10,5±0,6                 | 10,0±0,6                  |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 835      | 9,0±0,2                                | 9,0±0,2                 | 9,0±0,5                  | 8,5±0,3                   |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i> 1132 | 12,0±0,2                               | 11,0±0,2                | 10,0±0,2                 | 10,0±0,5                  |
| <i>Acinetobacter sp.</i> 1522                     | 0                             | 0                                      | 0                       | 0                        |                           |

## Продолжение таблицы 3

| 1   | 2                                  | 3        | 4        | 5        | 6        |
|---|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| L. fermentum 30<br>и L. cellobiosus<br>36 | <i>Proteus sp.</i>                 | 12,5±0,4 | 11,5±0,6 | 11,0±0,5 | 10,5±0,3 |
|   | <i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i> | 17,5±0,5 | 15,0±0,6 | 14,0±0,3 | 14,0±0,6 |
|   | <i>E. coli</i>                     | 18,0±0,5 | 16,0±0,4 | 16,0±0,6 | 15,0±0,5 |
|   | <i>S. gallinarum</i>               | 19,5±0,2 | 17,5±0,4 | 16,0±0,5 | 15,0±0,3 |
|   | <i>S. aureus</i> 3316              | 15,5±0,3 | 14,0±0,5 | 13,0±0,5 | 13,5±0,6 |
|   | <i>S. aureus</i> 9                 | 19,5±0,4 | 17,5±0,7 | 16,0±0,3 | 15,0±0,5 |
|   | <i>K. pneumoniae</i> 444           | 22,0±0,5 | 20,5±0,4 | 20,0±0,5 | 19,6±0,5 |
|   | <i>C. albicans</i>                 | 22,0±0,6 | 20,0±0,5 | 19,0±0,7 | 18,5±0,6 |
|   | <i>P. multocida</i>                | 22,0±0,7 | 20,0±0,4 | 19,0±0,5 | 18,0±0,5 |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 342           | 24,0±0,6 | 20,5±0,5 | 19,0±0,4 | 18,0±0,6 |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 835           | 22,0±0,5 | 20,0±0,3 | 19,0±0,2 | 18,5±0,4 |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i><br>1132   | 22,0±0,5 | 21,0±0,6 | 20,0±0,5 | 19,0±0,6 |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i><br>1522   | 12,0±0,3 | 11,0±0,4 | 10,0±0,5 | 10,0±0,4 |
|   | <i>Proteus sp.</i>                 | 12,5±0,4 | 11,0±0,5 | 10,0±0,2 | 10,5±0,4 |
| <i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i>        | 22,0±0,5                           | 20,0±0,5 | 19,0±0,5 | 19,0±0,3 |          |

Установлено, что после сублимационного высушивания антагонизм не выявлен у ассоциации бактерий *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 в отношении *Acinetobacter sp.* 1522. В отношении остальных тест-культур зоны подавления роста сухим препаратом уменьшились на 1- 2 мм в дальнейшем в течение срока наблюдений (12 месяцев) менялись незначительно. В сухом препарате исследуемой ассоциации культур антагонизм после сублимационного высушивания сохранился ко всем исследованным тест-культурам, при этом зоны подавления их роста были значительно выше, чем у противопоставляемой ассоциации, кроме тест-культуры *Proteus sp.* (зоны пдавления роста у обеих ассоциаций 12,5 мм). Сохранение антагонистической активности на достаточном уровне отмечено ко всем тест-культурам в течение 12 месяцев.

Сопоставление полученных данных показало, что ассоциация из культур *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 обладает более широким спектром антимикробного действия и более высокой антагонистической активностью по сравнению с ассоциацией *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2. Так, в отличие от противопоставляемой ассоциации, у нее выявлена антагонистическая активность в отношении *Acinetobacter sp.* 1522 и *Shigella flexneri* 11, а также отмечено повышение антагонизма в отношении всех исследованных тест-культур, в особенности к *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 и *Mycobacterium B<sub>5</sub>*.

Таким образом, установлено, что ассоциация со штаммами *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36, превосходит в жидком и сухом виде известную ассоциацию *L. fermentum* 27 + *L. plantarum* 2в/2 по титру бактерий, а также по спектру антимикробного действия и величине антагонистической активности.

**Литература:**

1 World Health Organization, *World health statistics 2011*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564199> Accessed: 10.01.2023

2 “Заболеваемость населения Республики Казахстан в 2019 году” <https://www.zakon.kz/5008014-zabolevaemost-naseleniya-respubliki.html> Дата обращения: 09.01.2023

3 Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic Resistance in Modern World. *Pediatr. Pharmacol.*, 2017, 14(5): 341–354 (doi: 10.15690/pf.v14i5.1782).

4 S. Prakash *et al.* Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol. Targets Ther.*, 2011: 71 (doi: 10.2147/btt.s19099).

- 5 Ianiro G., Bibbò S., Gasbarrini A. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8): 762–770.
- 6 Ушкалова Е. А., Зырянов С. К. Место препаратов, влияющих на микробиоту кишечника, в современной медицине. *Педиатрия*, 2017, 2:37-42.
- 7 Sturov N. V., Popov S. V., Zhukov V. A. Modern approaches to the correction of the gut microbiota. *Meditinskiy Sov.*, 2021, 2021(4):136–143 (doi: 10.21518/2079-701X-2021-4-136-143).
- 8 Merenstein D., Salminen. S. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 2017: 35.
- 9 Millette M., Nguyen A., Amine K. M., Lacroix M. GASTROINTESTINAL SURVIVAL OF BACTERIA IN COMMERCIAL PROBIOTIC PRODUCTS. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2013, 8(4): 149–156.
- 10 Мендибаева Б.Б. Социально-гигиеническая оценка особенности формирования кишечной инфекции населения Южно-Казахстанской области. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*, 2017, 2: 450–455.
- 11 Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Ассоциация бактерий для производства препарата Плантафермин (варианты). Ин.патент № 21861 РК. Опубл. 16.11.2009 г., Бюл. №11.
- 12 А.К. Саданов, Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова. Штамм бактерий *Lactobacillus plantarum* 2в/2, предназначенный для включения в состав лечебно-профилактических препаратов против желудочно-кишечных заболеваний. Патент №30868 РК. Опубл. 25.12.2015 г., Бюл. №12.
- 13 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках, 1994.
- 14 Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М., 1975.

А.К. САДАНОВ, Н.Н. ГАВРИЛОВА, И.А. РАТНИКОВА\*, С.Э. ОРАЗЫМБЕТ,  
Е.Ж. ШОРАБАЕВ, Ж.Т. МУСАБЕКОВ, Р.Ж. КАПТАГАЙ, Л.Е. ПРОТАСЮК,  
Л.А. КОШЕЛЕВА, С.Б. ДЖАЙЛЯУОВА  
Өндірістік микробиология, Алматы, Қазақстан  
\*e-mail: iratnikova@list.ru

## МИКРОБҚА ҚАРСЫ ӘСЕРІНІҢ КЕҢ СПЕКТРІ БАР ДӘРІЛІК ПРОБИОТИКАЛЫҚ ПРЕПАРАТТЫ ӨНДІРУГЕ АРНАЛҒАН БАКТЕРИЯЛАР ҚАУЫМДАСТЫҒЫ

### Түйін

Екі пробиотикалық қауымдастықтың антагонистік белсенділігін зерттеу кезінде, *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 штаммдарымен бірге ассоциация сұйық және құрғақ түрде микробқа қарсы әсер ету спектрі және тиімді емдік пробиотикалық препараттарды жасау үшін пайдаланылуы мүмкін антагонистік белсенділік шамасы бойынша белгілі *L. fermentum* 27 и *L. plantarum* 2в/2 қауымдастығынан асып түсетіні анықталды.

**Кілтті сөздер:** бактериялар қауымдастығы, пробиотик, антагонизм, ішек инфекциясы.

IRSTI: 34.27.51

A.K. SADANOV, N.N. GAVRILOVA, I.A. RATNIKOVA\*, S.E. ORAZYMBET,  
E.ZH. SHORABAEV, ZH.T. MUSABEKOV, R.ZH. KAPTAGAI, L.E. PROTASIUK,  
L.A. KOSHELEVA, S.B. DZHAILAUOVA  
Industrial Microbiology, Almaty, Kazakhstan  
\*e-mail: iratnikova@list.ru

## BACTERIA ASSOCIATION FOR THE PRODUCTION OF A THERAPEUTIC PROBIOTIC DRUG WITH A WIDE SPECTRUM OF ANTIMICROBIAL ACTION

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.07

### Abstract

When studying the antagonistic activity of two probiotic associations, it was found that the association with *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 strains exceeds the known association of *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 in terms of the spectrum of antimicrobial action and the magnitude of antagonistic activity in both liquid and dry forms. This features can be used to create effective therapeutic probiotic preparations.

**Keywords:** bacteria association, probiotic, antagonism, intestinal infections.

Acute intestinal infections (AII) are one of the urgent health problems in all countries [1], including Kazakhstan. Thus, in Kazakhstan, among the diagnosed infectious diseases in January-December 2019, AII was in second place after acute respiratory infections - 22997 cases [2]. The ubiquity, high incidence of moderate and severe forms, and complications determine the need to find ways to optimize the tactics of treating this group of diseases.

The complexity of the infectious diseases treatment is associated with the massive irrational antibiotics and chemotherapeutic drugs use, which led to the pathogens' multidrug resistance development [3]. Moreover, the use of antibiotics is often accompanied by a change in the qualitative and quantitative composition of the intestinal microbiota. It has been shown that microbiota disorders (dysbiosis) predispose to the development of various diseases of the gastrointestinal tract, atopy, obesity, metabolic syndrome, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, malignant neoplasms, and possibly other pathologies [4-7]. Therefore, recently in the world it is increasingly recommended to use probiotics based on microorganisms - symbionts of the gastrointestinal tract for the treatment of intestinal diseases instead of antibiotics.

Nowadays, pharmacological probiotic preparations are considered as the most sufficient and effective means for human microecology correction and maintenance at an optimal level.

Probiotics belong to the group of medical immunobiological preparations based on live bacteria, antagonistically active against pathogenic and opportunistic microorganisms that cause various infectious diseases and do not adversely affect representatives of the normal human microflora. Generally, probiotic preparations are used for the prevention and treatment of acute intestinal infections and the correction of dysbiotic conditions. Such therapy is often accompanied by positive changes in the system of nonspecific immunological defense of the body and leads to increased body resistance to the adverse factors.

On the modern market, there are many foreign probiotic preparations based on live microorganisms. The ranking of the best probiotics that normalize the gastrointestinal tract function, increase immunity, and improve metabolic processes includes: Bifidumbacterin, Bifidumbacterin Forte, Lactobacterin, Probifor, Acipol (Russia), Enterol (France), Biform (Denmark) [8]. However, widely used therapeutic probiotics for the intestinal infections treatment are not always effective [9, 10]. The reason is a narrow spectrum of antimicrobial action and the absence of the antagonists' selection to the specific pathogens.

One of the main criteria for the selection of microorganisms for the probiotics composition is the severity of their antagonistic activity against various infectious pathogens.

According to the above-mentioned, the purpose of this study was the selection of the most active probiotic association in terms of antagonistic activity in order to create a probiotic that is active against pathogens of intestinal and extraintestinal infections. The Plantafermin preparation consisting of *L.fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 association, that demonstrated efficacy in intestinal infections treatment, was used as a control [11, 12].

### Materials and methods

An association of *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 was selected from the collection of human origin lactic acid bacteria with high antimicrobial and enzymatic activity.

The *L. fermentum* 30 strain was obtained from a population of freeze-dried *L. fermentum* 29 culture isolated from the intestines of a healthy person. It is represented by gram-positive, asporogenic, immobile, rods 0.5-0.7x1.0-3.0  $\mu\text{m}$  in size with blunt ends, often single, but short chains can also be found. On a dense nutrient medium, it forms flat, round, rough colonies. In a liquid nutrient medium, a uniform turbidity is present. The culture ferments galactose, lactose, maltose, mannose, melibiose, raffinose, and sucrose, while cellobiose, mannitol, rhamnose, xylose, and sorbitol are not fermented or weakly fermented. Restores nitrates, forms ammonia using arginine, weakly acidifies milk and hydrolyzes starch. Optimum growth is detected at 37°C, at 45°C the culture grows well, at 15°C the growth is limited. Organic nitrogen sources, such as peptone, yeast autolysate, meat extract, corn extract, and malt sprout extract are utilized. The *L. fermentum* 30 strain does not form H<sub>2</sub>S and indole, does not have catalase activity and is not pathogenic. It has high antimicrobial activity with a wide spectrum of action and increased resistance to drying.

The *L. cellobiosus* 36 strain was isolated from a population of freeze-dried culture of *L. cellobiosus* 35. It is represented by rods with rounded ends of variable sizes: 0.5-0.7x1.5-5.5  $\mu\text{m}$ , immobile, asporogenic, and gram-positive. The rods are located separately, in short (3-5 cells each) or longer chains. In a liquid nutrient medium, a uniform suspension with a transparent ring in the upper layer is usually formed. Superficial colonies on a dense nutrient medium are flat and rhizoidal, while the profound ones are light yellow and lenticular. The strain ferments arabinose, ribose, cellobiose, galactose, glucose, gluconate, raffinose, maltose, melibiose, and sucrose. Has a weak reaction to lactose, mannose, and xylose. It forms CO<sub>2</sub> during the fermentation of glucose and gluconate, does not ferment mannitol and rhamnose. The *L. cellobiosus* 36 strain forms ammonia from arginine, does not ferment milk for two days. Grows at 15°C, but not at 45°C. The optimum temperature for growth is 35°C. The strain uses organic sources of nitrogen: peptone, yeast autolysate or extract and meat extract, does not form Indole and H<sub>2</sub>S and is not pathogenic. It has high antimicrobial activity with a wide spectrum of action. The strains are harmless for human and animal.

*L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 association and *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association were used in this study. Each bacterial combination was cultivated separately for 24 hours at 35°C in a nutrient medium with the following composition (g/l): glucose - 15.0; yeast extract - 5.0; meat extract - 5.0; peptone - 10.0; ammonium citrate - 2.0; sodium acetate - 2.0; potassium phosphate 1-substituted - 2.0; sodium 2-substituted phosphate - 2.0; magnesium sulfate - 0.2; manganese sulfate - 0.05; cobalt chloride - 0.01; pH - 6.5-7.0; fresh water - up to 1 liter.

For freeze drying, protective components were added to liquid associations: 7% sucrose and 1.5% gelatin + 7% SMP. After that, the preparations were poured into sterile penicillin vials of 5 ml and dried in a Liobeta-35 freeze dryer. The accumulated experimental batches of dry preparations were stored in the refrigerator at temperatures from 2 to 8°C.

Then the antagonistic activity against *Staphilococcus aureus* MRSA 9, *Staphilococcus aureus* MRSA 3316, *Shigella flexneri* 11, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumonia* 444, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa* 835, *Pseudomonas aeruginosa*



342, *Proteus sp.* *Mycobacterium B5*, and *Candida albicans* test cultures was determined through the evaluation of growth inhibition zones [13].

The number of microorganisms in dry preparations was determined by a series of dilutions in sterile tap water and inoculation into an MRS agar nutrient medium, followed by counting the grown colonies.

For mathematical processing of the results, standard methods for finding the mean values and their mean errors were used [14]. The statistical significance of the results obtained was determined by Student's t-test. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The results of assessment of the antagonistic activity of the studied associations after their cultivation for 24 hours in a liquid nutrient medium are presented in Table 1.

Table 1– Comparative characteristics of different bacterial associations’ antagonistic activity.

| Test-cultures                 | Test-cultures' growth inhibition zones, mm        |   |
|-------------------------------|---|---|
|                               | Bacterial associations                            |   |
|                               | <i>L. fermentum</i> 27 + <i>L. plantarum</i> 2B/2 | <i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36 |
| 1                             | 2   | 3   |
| <i>E. coli</i>                | 15,5±0,7  | 22,0±0,3  |
| <i>S. gallinarum</i>          | 14,0±0,9  | 21,0±0,4  |
| <i>Sh. flexneri</i> 11        | 0   | 17,0±0,5  |
| <i>S. aureus</i> 3316         | 14,0±0,5  | 17,0±0,5  |
| <i>S. aureus</i> 9            | 17,5±0,5  | 25,0±0,4  |
| <i>K. pneumoniae</i> 444      | 18,0±0,3  | 26,0±0,5  |
| <i>C. albicans</i>            | 16,0±0,2  | 25,0±0,3  |
| <i>P. multocida</i>           | 18,0±0,3  | 25,0±0,5  |
| <i>P.aeruginosa</i> 342       | 13,0±0,8  | 26,0±0,7  |
| <i>P.aeruginosa</i> 835       | 9,0± 0,2  | 22,0±0,6  |
| <i>Acinetobacter sp.</i> 1132 | 15,0± 0,5   | 26,0±0,5  |
| <i>Acinetobactersp.</i> 1522  | 0   | 16,0±0,5  |
| <i>Proteus sp.</i>            | 14,0±0,5  | 18,0±0,6  |
| <i>Mycobacterium B5</i>       | 20,0±1,0  | 28,0±0,9  |

As can be seen from the table, the association of strains *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 has a wider spectrum of action and higher antimicrobial activity compared to the *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2. In contrast to another association, it demonstrated an antagonistic activity against *Acinetobacter sp.* 1522 and *Shigella flexneri* 11, and an increase in antagonism against all studied test cultures, especially *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter sp.* 1132 and *Mycobacterium B5*.

The titer of bacteria of the studied associations was determined in freeze-dried preparations and after their storage for 4, 7, and 12 months in the refrigerator (table 2).

Table 2 - The content of probiotic bacteria viable cells in freeze-dried preparations and after their storage in the refrigerator

| Assosiations  | Liquid culture titer, billion CFU/ml | The content of microbial cells in freeze-dried preparations, billion CFU/g |                           |                           |                            |
|---|--------------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|   |                                      | Initial after freeze-drying  | After 4 months of storage | After 7 months of storage | After 12 months of storage |
| <i>L. fermentum</i> 27 and <i>L. plantarum</i> 2B/2 | 6.5±0.3x10 <sup>9</sup>              | 3.8±0.3x10 <sup>9</sup>  | 3.0±0.3x10 <sup>9</sup>   | 3.0±0.2x10 <sup>9</sup>   | 2.0±0.2x10 <sup>9</sup>    |
| <i>L. fermentum</i> 30 and <i>L. Cellobiosus</i> 36 | 7.8±0.4x10 <sup>9</sup>              | 6.7±0.3x10 <sup>9</sup>  | 6.0±0.3x10 <sup>9</sup>   | 6.0±0.3x10 <sup>9</sup>   | 5.6±0.2x10 <sup>9</sup>    |

According to the results presented in the table, it can be seen that the viability of probiotic bacteria was well preserved in dry preparations during the observation period (12 months). A higher titer of bacteria was noted in the association of *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36.

The antagonistic activity of probiotic preparations after freeze-drying and storage was also studied (Table 3).

Table 3 - Antagonistic activity of freeze-dried associations, initial and after 4, 7, and 12 months of storage

| Assosiation   | Test-cultures                      | Test-cultures' growth inhibition zones, mm |                           |                           |                            |
|---|------------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|   |                                    | Initial after freeze-drying                | After 4 months of storage | After 7 months of storage | After 12 months of storage |
| <i>L. fermentum</i> 27 and <i>L. plantarum</i> 2B/2 | <i>E. coli</i>                     | 13.0±0.5                                   | 12.5±0.4                  | 12.0±0.5                  | 11.5±0.5                   |
|   | <i>S. gallinarum</i>               | 10.5±0.2                                   | 9.5±0.4                   | 9.0±0.4                   | 9.0±0.3                    |
|   | <i>S. aureus</i> 3316              | 12.5±0.3                                   | 11.0±0.5                  | 11.0±0.7                  | 10.5±0.6                   |
|   | <i>S. aureus</i> 9                 | 14.0±0.5                                   | 12.5±0.6                  | 12.0±0.3                  | 12.0±0.6                   |
|   | <i>K. pneumoniae</i> 444           | 15.5±0.6                                   | 13.5±0.3                  | 13.0±0.5                  | 12.6±0.4                   |
|   | <i>C. albicans</i>                 | 13.0±0.3                                   | 12.0±0.5                  | 12.0±0.6                  | 11.5±0.3                   |
|   | <i>P. multocida</i>                | 15.0±0.5                                   | 14.0±0.2                  | 13.0±0.5                  | 12.0±0.4                   |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 342           | 11.0±0.4                                   | 10.5±0.3                  | 10.5±0.6                  | 10.0±0.6                   |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 835           | 9.0±0.2                                    | 9.0±0.2                   | 9.0±0.5                   | 8.5±0.3                    |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i> 1132      | 12.0±0.2                                   | 11.0±0.2                  | 10.0±0.2                  | 10.0±0.5                   |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i> 1522      | 0  | 0                         | 0                         | 0                          |
|   | <i>Proteus sp.</i>                 | 12.5±0.4                                   | 11.5±0.6                  | 11.0±0.5                  | 10.5±0.3                   |
|   | <i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i> | 17.5±0.5                                   | 15.0±0.6                  | 14.0±0.3                  | 14.0±0.6                   |
| <i>L. fermentum</i> 30 and <i>L. cellobiosus</i> 36 | <i>E. coli</i>                     | 18.0±0.5                                   | 16.0±0.4                  | 16.0±0.6                  | 15.0±0.5                   |
|   | <i>S. gallinarum</i>               | 19.5±0.2                                   | 17.5±0.4                  | 16.0±0.5                  | 15.0±0.3                   |
|   | <i>S. aureus</i> 3316              | 15.5±0.3                                   | 14.0±0.5                  | 13.0±0.5                  | 13.5±0.6                   |
|   | <i>S. aureus</i> 9                 | 19.5±0.4                                   | 17.5±0.7                  | 16.0±0.3                  | 15.0±0.5                   |
|   | <i>K. pneumoniae</i> 444           | 22.0±0.5                                   | 20.5±0.4                  | 20.0±0.5                  | 19.6±0.5                   |
|   | <i>C. albicans</i>                 | 22.0±0.6                                   | 20.0±0.5                  | 19.0±0.7                  | 18.5±0.6                   |
|   | <i>P. multocida</i>                | 22.0±0.7                                   | 20.0±0.4                  | 19.0±0.5                  | 18.0±0.5                   |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 342           | 24.0±0.6                                   | 20.5±0.5                  | 19.0±0.4                  | 18.0±0.6                   |
|   | <i>P. aeruginosa</i> 835           | 22.0±0.5                                   | 20.0±0.3                  | 19.0±0.2                  | 18.5±0.4                   |
|   | <i>Acinetobacter sp.</i> 1132      | 22.0±0.5                                   | 21.0±0.6                  | 20.0±0.5                  | 19.0±0.6                   |
|   | <i>Acinetobactersp.</i> 1522       | 12.0±0.3                                   | 11.0±0.4                  | 10.0±0.5                  | 10.0±0.4                   |
|   | <i>Proteus sp.</i>                 | 12.5±0.4                                   | 11.0±0.5                  | 10.0±0.2                  | 10.5±0.4                   |
|   | <i>Mycobacterium B<sub>5</sub></i> | 22.0±0.5                                   | 20.0±0.5                  | 19.0±0.5                  | 19.0±0.3                   |

It was established that after freeze-drying, no antagonism was detected for the *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2 association against *Acinetobacter sp.* 1522. In relation to the rest test cultures, the zones of growth suppression by the dry preparation decreased by 1-2 mm, and then changed insignificantly during the observation period (12 months). In a dry preparation from the studied association, the antagonistic activity after freeze-drying was preserved towards all the studied test cultures, while the zones of growth inhibition were significantly higher than in the opposite association, except for the *Proteus sp.* test culture (growth suppression zones in both associations were 12,5 mm). The preservation of antagonistic activity at a sufficient level was noted for all test cultures for 12 months.

The comparison of the obtained data showed that the *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association has a wider spectrum of antimicrobial activity and higher antagonistic activity

compared to the association of *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/2. So, in contrast to the opposing association, it showed antagonistic activity against *Acinetobacter* sp. 1522 and *Shigella flexneri* 11, as well as an increase in antagonism against all of the studied test cultures, especially against *K. pneumoniae* 444, *S. aureus* 9, *C. albicans*, *P. multocida*, *P. aeruginosa* 342, *Acinetobacter* sp. 1132 and *Mycobacterium* B<sub>5</sub>.

Thus, it has been established that the *L. fermentum* 30 and *L. cellobiosus* 36 association exceeds the known *L. fermentum* 27 and *L. plantarum* 2B/ 2 association in both liquid and dry forms by the microbial titer, as well as by the spectrum of antimicrobial action and the magnitude of antagonistic activity.

#### References:

- 1 World Health Organization, *World health statistics 2011*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564199> Accessed: 10.01.2023
- 2 Zaboлева most' naselenija Respubliki Kazahstan v 2019 godu. Available: <https://www.zakon.kz/5008014-zaboлева-most-naseleniya-respubliki.html> Accessed: 09.01.2023
- 3 Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic Resistance in Modern World. *Pediatr. Pharmacol.*, 2017, 14(5): 341–354 (doi: 10.15690/pf.v14i5.1782).
- 4 S. Prakash *et al.* Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol. Targets Ther.*, 2011: 71 (doi: 10.2147/btt.s19099).
- 5 Ianiro G., Bibbò S., Gasbarrini A. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8): 762–770.
- 6 Ushkalova E. A., Zyrjanov S. K. Mesto preparatov, vlijajushhih na mikrobiotu kishechnika, v sovremennoj medicine. *Pediatrics*, 2017, 2:37-42.
- 7 Sturov N. V., Popov S. V., Zhukov V. A. Modern approaches to the correction of the gut microbiota. *Meditsinskiy Sov.*, 2021, 2021(4):136–143 (doi: 10.21518/2079-701X-2021-4-136-143).
- 8 Merenstein D., Salminen. S. Probiotics and prebiotics. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines*, 2017: 35.
- 9 Millette M., Nguyen A., Amine K. M., Lacroix M. GASTROINTESTINAL SURVIVAL OF BACTERIA IN COMMERCIAL PROBIOTIC PRODUCTS. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2013, 8(4): 149–156.
- 10 Mendibaeva B.B. Social'no-gigienicheskaja ocenka osobennosti formirovaniya Kishechnoj infekcii naselenija Juzhno-Kazahstanskoj oblasti. *Vestnik Kazahskogo Nacional'nogo medicinskogo universiteta*, 2017, 2: 450–455.
- 11 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Associaciya bakterij dlja proizvodstva preparata Plantafermin (varianty). In patent № 21861 RK. Opubl. 16.11.2009 g., Bjul. №11.
- 12 A.K. Sadanov, N.N. Gavrilova, I.A. Ratnikova. Shtamm bakterij *Lactobacillus plantarum* 2v/2, prednaznachennyj dlja vkljuchenija v sostav lechebno-profilakticheskikh preparatov protiv zheludochno-kishechnyh zabozevanij. Patent №30868 RK. Opubl. 25.12.2015 g., Bjul. №12.
- 13 Egorov N.S. Osnovy uchenija ob antibiotikah, 1994.
- 14 Urbah V.Ju. Statisticheskij analiz v biologicheskikh i medicinskih issledovanijah. M., 1975.