

Разработка пробиотического консорциума для людей с онкологическими заболеваниями

Анна Д. Веснина	¹	koledockop1@mail.ru	 0000-0002-4552-7418
Александр Ю. Просеков	¹	aprosekov@rambler.ru	 0000-0002-5630-3196
Оксана В. Козлова	¹	ms.okvk@mail.ru	 0000-0002-2960-0216
Марина Г. Курбанова	¹	kurbanova-mg@mail.ru	 0000-0003-0563-1007
Евгения А. Козленко	¹	evgenia_09.01@mail.ru	 0000-0002-6708-5964
Юлия В. Голубцова	¹	op.kemsu@mail.ru	 0000-0002-2958-4172

¹ Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6. Кемерово, 650000, Россия

Аннотация. По данным Всемирной организации здравоохранения онкологические заболевания являются распространенной причиной смертности населения, в результате чего актуальна разработка мероприятий, направленных на профилактику канцерогенеза. Данное исследование посвящено получению пробиотического консорциума, состоящего из бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта здорового человека, с дальнейшей перспективой его применения в противораковой терапии в виде биологически активной добавки (БАД) в специализированных продуктах питания. Объектом исследования являлись бактерии, выделенные из фекалий здорового человека, и консорциумы на их основе. Идентификация бактерий и исследование антимикробной, антиоксидантной активности, противоопухолевых свойств, устойчивости к антибиотикам, кислой среде и желчи бактерий и консорциумов на их основе проводилось по общепринятым методикам. Результатами исследования является формирование консорциумов из выделенных и идентифицированных бактерий: №1 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, №2 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, №3 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. salivarius*, №4 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. thermophiles*, проявляющих пробиотические свойства. Антимикробную активность к наибольшему количеству тест-культур проявлял консорциум №2; умеренную устойчивость к наибольшему числу антибиотиков – №1 и №2; наибольшую антиоксидантную активность – №1, наиболее выраженными противораковыми свойствами по отношению к HepG2, ЛБР2, MDA-MB-231, U87 и Panc-1 – №4, а к MCF-7 – №3; наибольшую устойчивость к средам с низкой кислотностью и желчью – №2. По результатам исследования видно, что выделенные штаммы, как и консорциумы на их основе, обладали антимикробной, антиоксидантной активностью, проявляли противоопухолевое действие, устойчивость к действию антибиотиков, желчи и кислой среды, благодаря чему, их можно использовать в качестве пробиотических средств в виде БАД и специализированных молочнокислых продуктов для профилактики канцерогенеза.

Ключевые слова: пробиотические свойства, канцерогенез, микробиота кишечника, идентификация микроорганизмов, молочнокислые бактерии, противораковые свойства

Development of a probiotic consortium for people with cancer

Anna D. Vesnina	¹	koledockop1@mail.ru	 0000-0002-4552-7418
Alexander Yu. Prosekov	¹	aprosekov@rambler.ru	 0000-0002-5630-3196
Oksana V. Kozlova	¹	ms.okvk@mail.ru	 0000-0002-2960-0216
Marina G. Kurbanova	¹	kurbanova-mg@mail.ru	 0000-0003-0563-1007
Evgeniya A. Kozlenko	¹	evgenia_09.01@mail.ru	 0000-0002-6708-5964
Yulia V. Golubtsova	¹	op.kemsu@mail.ru	 0000-0002-2958-4172

¹ Kemerovo State University, st. Red, 6. Kemerovo, 650000, Russia

Abstract. According to the World Health Organization, oncological diseases are a common cause of mortality in the population, as a result of which the development of measures aimed at the prevention of carcinogenesis is urgent. This study is devoted to obtaining a probiotic consortium consisting of bacteria isolated from the gastrointestinal tract of a healthy person, with the further prospect of its use in anticancer therapy in the form of a biologically active additive (BAA) in specialized food products. The object of the study was bacteria isolated from the feces of a healthy person, and consortia based on them. The identification of bacteria and the study of antimicrobial, antioxidant activity, antitumor properties, resistance to antibiotics, acidic medium and bile of bacteria and consortia based on them were carried out according to generally accepted methods. The results of the study are the formation of consortia of isolated and identified bacteria: № 1 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, № 2 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, № 3 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. salivarius*, № 4 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. thermophiles* exhibiting probiotic properties. Consortium № 2 showed antimicrobial activity to the largest number of test cultures; moderate resistance to the largest number of antibiotics – № 1 and № 2; the highest antioxidant activity – № 1, the most pronounced anti-cancer properties in relation to HepG2, LBR2, MDA-MB-231, U87 and Panc-1 – № 4, and to MCF-7 – № 3; the greatest resistance to environments with low acidity and bile – № 2. According to the results of the study, it can be said that the isolated strains, like the consortia based on them, had antimicrobial, antioxidant activity, showed an antitumor effect, resistance to antibiotics, bile and an acidic environment, so that they can be used as probiotic agents in the form of dietary supplements and specialized lactic acid products for the prevention of carcinogenesis.

Keywords: probiotic properties, carcinogenesis, intestinal microbiota, identification of microorganisms, lactic acid bacteria, anti-cancer properties

Для цитирования

Веснина А.Д., Просеков А.Ю., Козлова О.В., Курбанова М.Г., Козленко Е.А., Голубцова Ю.В. Разработка пробиотического консорциума для людей с онкологическими заболеваниями // Вестник ВГУИТ. 2021. Т. 83. № 1. С. 219–232. doi:10.20914/2310-1202-2021-1-219-232

For citation

Vesnina A.D., Prosekov A.Yu., Kozlova O.V., Kurbanova M.G., Kozlenko E.A., Golubtsova Yu.V. Development of a probiotic consortium for people with cancer. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2021. vol. 83. no. 1. pp. 219–232. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2021-1-219-232

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Введение

Микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) влияет на здоровое состояние организма, регулируя его метаболическую, защитную, координирующую и эпигенетическую функции [1]. Она участвует в развитии канцерогенеза – существует взаимосвязь между канцерогенезом, его лечением и микробиотой, которая прослеживается в следующих аспектах [2]:

1. Наличие и развитие опухоли негативно сказывается на функционирование микробиоты, через токсины, вырабатываемые раковыми клетками [3], приводящими к дисбактериозу.

2. У онкобольных после лечения иммунная система ослаблена, происходит накопление метаболитов раковых клеток, наблюдается прирост патогенных бактерий в организме, что вызывает дисбактериоз, еще больше нарушающий функционирование иммунной системы [4].

3. Нарушение нормальной работы микрофлоры, из-за негативных факторов окружающей среды, приводит к развитию дисбактериоза, вследствие которого уменьшается разнообразие микробиоты, иммунная система кишечника подвергается атаке патогенных, условно-патогенных бактерий, способствующих развитию воспалений, ряда патологических процессов: снижению общего иммунитета, изменению гомеостаза, возникновению воспаления и канцерогенеза [5, 6].

Для нормализации работы микрофлоры ЖКТ необходим прием пробиотических препаратов [1]. Пробиотики – это живые непатогенные микроорганизмы, употребление которых способствует поддержанию нормальной работоспособности микрофлоры кишечника и всего организма в целом [7].

В основном к пробиотикам относят молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* и микроорганизмы, не относящиеся к молочнокислым бактериям, рода *Bacillus*, *Saccharomyces*, и *Escherichia coli*. Для того, чтобы микроорганизмы можно было отнести к пробиотикам, они должны соответствовать ряду критериев, представленных в работе P. Markowiak [8]:

– критерию безопасности, то есть иметь человеческое или животное происхождение, быть идентифицированными, обладать устойчивостью к действию антибиотиков и т. п.;

– критерию функциональности, то есть должны быть конкурентоспособными по отношению к микробиоте ЖКТ, устойчивыми к действию желчи, ферментам, низкому уровню рН в желудке, обладать антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным штаммам;

– критерию технологической полезности, то есть накапливать большое количество биомассы, сохранять жизнеспособность и функциональность при хранении (при замораживании и сублимационном высушивании) и т. п.

В рамках данной работы, микроорганизмы должны обладать противораковой и антиоксидантной активностью. Роль пробиотиков в онкологии представлена на рисунке 1 [2, 4].

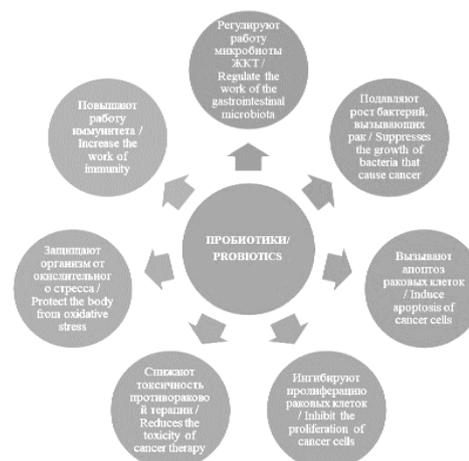


Рисунок 1. Пробиотики и профилактика рака
Figure 1. Probiotics and cancer prevention

Цель работы – создание пробиотического консорциума, состоящего из бактерий, выделенные из ЖКТ здорового человека, использование которого в качестве компонента функциональных, специализированных продуктов питания или в качестве БАД к диетическим рекомендациям станет частью противоопухолевой терапии.

Материалы и методы

Работа осуществлялась на базе Лаборатории биотестирования природных нутрицевтиков НИУ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» (Россия). Объектом исследования являлись штаммы бактерий, выделенные из ЖКТ здорового человека, и разработанные на их основе консорциумы.

Для выделения молочнокислых бактерий из ЖКТ использовали фекалии здорового человека, из которых готовили суспензию и серию разведений. Разведения рассаживали на питательные среды: Рогоза (HiMedia Laboratories, Индия), Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), MRS (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Бифидум (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), M17 (HiMedia Laboratories, Индия), Bifidobacterium Agar (HiMedia Laboratories, Индия) [9, 10]. Культивирование осуществляли в анаэробных условиях в CO₂-инкубаторе

ИЛМ-170-01-«Ламинар-С» (LAMSYSTEMS, Россия) при температуре 37 °С в течение 24–48 часов.

Предварительная идентификация выделенных колоний молочнокислых бактерий (колонии заранее пересаживали на агаризованную среду MRS [11]) осуществлялась с помощью определения культуральных и морфологических свойств штаммов, при использовании микроскопа Микмед-5 (ЛМО, Россия), набора окраски по Граму (Лаб-Биомед, Россия), общепринятых стандартов (ГОСТ 10444.11–89 [12, 13] и Определителя Берджи (Берге) [14]. Принадлежность штаммов к виду определяли с помощью микробиологического анализатора VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция).

Антимикробную активность определяли методом диффузии в лунках агара, методика прописана в исследовании А. Davoodabadi и его коллег [15]. Использовали следующие тест-культуры: *Escherichia coli* В-6954, *Bacillus fastidiosus* В-5651, *Pseudomonas fluorescens* В-3502, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Leuconostoc mesenteroides* В-8404, *Candida albicans* ATCC 885–653, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), предоставленные ФГБУ «Кемеровская МВЛ», Россия. При зоне ингибирования диаметром менее 11 мм штамм не проявлял активность, при зоне в 11–16 мм штамм проявлял слабую активность, а при зоне в 17–22 мм – среднюю активность, зона более 23 мм – высокую активность [16].

Антибиотикорезистентность определяли с помощью диско-диффузионного метода, описанного в работе Y. Yang и его коллег [17]. В методе использовали диски, пропитанные бензилпенициллином (10 мкг), стрептомицином (10 мкг), тетрациклином (30 мкг), ампициллином (10 мкг), канамицином (30 мкг), хлорамфениколом (30 мкг), гентамицином (10 мкг) (HiMedia Laboratories, Индия). При зоне ингибирования диаметром менее 15 мм штамм являлся устойчивым, при зоне в 16–20 мм штамм обладал умеренной устойчивостью, а при зоне более 21 мм штамм проявлял чувствительность по отношению к антибиотику [18].

Антиоксидантную активность определяли с помощью анализа по спектрофотометрическому определению DPPH, описанному в работе Ruzynska K. и Pekal A [19]. Методика определения представлена в работе Н.С. Карамовой и Р.Э. Хабибуллина [20, 21].

Противоопухолевые свойства анализировали *in vitro* с помощью раковых клеток: HepG2, ЛБР2, MDA-MB-231, MCF-7, U87, Panc-1 (Cancer Center Karolinska, Швеция), методика анализа представлена в работе Бабиц О.О. [22].

Устойчивость к неблагоприятным условиям ЖКТ, а именно кислотостойкость и устойчивость к желчи были определены по методикам, описанным в работе А. Sharma и ее коллег [23].

Определение биосовместимости реализовывали по капельной методике, описанной в работе Волковой Г.С. и ее коллег [24].

Для того, чтобы получить максимальное накопление биомассы при культивировании консорциумов, подбирали оптимальные питательные среды. Рассматривали прирост биомассы путем культивирования на среде Рогоза, MRS, Лактобакагаре при 37°С в течение 24 ч, измерение количества клеток проводили каждые 2 ч. Количественный учет выросших микроорганизмов проводили, используя метод разведений, представленный в работе А.И. Нетрусова и его коллег [25].

Для консорциумов изучение антимикробной активности, антибиотикорезистентности, антиоксидантной активности, противоопухолевых свойств и устойчивости к кислой среде и желчи проводили по вышеописанным методикам.

Хранение пробиотических консорциумов осуществлялось путем высушивания с помощью сублимационной сушилки «ИНЕЙ-6» (ИБП-РАН, Россия). Методика описана в работе В.А. Несчислаева и И.В. Фадеева [26].

Результаты

1.1 Идентификация колоний, выделенных из биоматериала

Результаты определения культуральных и морфологических свойств (таблица 1), выросших в анаэробных условиях колоний, выделенных из биоматериала здорового человека свидетельствовали о том, что колонии № 1 и № 2 относились к роду *Bifidobacterium*, так как имели характерные культуральные и морфологические признаки, присущие данному роду и росли на среде Блаурокка и Бифидум-среде. Колонии № 3, № 4, № 5 относились к роду *Lactobacillus* и росли на селективных средах (Рогоза, Лактобакагар, *Bifidobacterium Agar*). Колонии № 6, № 7, № 8 относились к роду *Streptococcus* и росли на селективной среде M17.

Результаты видовой идентификации выделенных колоний анализатором VITEK 2 Compact свидетельствовали о том, что колония:

- № 1 – *Bifidobacterium bifidum*,
- № 2 – *Bifidobacterium breve*,
- № 3 – *Lactobacillus plantarum*,
- № 4 – *Lactobacillus acidophilus*,
- № 5 – *Lactobacillus fermentum*,
- № 6 – *Streptococcus salivarius*,
- № 7 – *Streptococcus agalactiae*,
- № 8 – *Streptococcus thermophilus*.

Таблица 1.
Культуральные и морфологические свойства колоний бактерий, выросших на среде MRS

Table 1.

Cultural and morphological properties of bacterial colonies grown on MRS medium

Признаки Signs	Колонии Colonies			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
<i>Культуральные признаки / Cultural traits</i>				
Форма колонии Colony form	круглая round	точка с хвостиком tail point	круглая round	
Размер колонии Colony size	мелкие small			
Цвет колонии Colony color	белый white			
Рельеф колонии Colony relief	плоский flat	куполообразный dome-shaped	выпуклый convex	
Блеск колонии Colony glitter	блестящая shiny			
Прозрачность колонии Colony transparency	непрозрачная opaque			
Характер краев колонии Edges of the colony	ровные flat	шероховатые rough	волнистые wavy	ровные flat
<i>Морфологические признаки / Morphological signs</i>				
Форма Form	палочки V-образной формы V-shaped sticks	палочки Y-образной формы Y-shaped sticks	длинные палочки long sticks	
Подвижность Mobility	неподвижные motionless			
Споры spore	отсутствуют absent			
Окраска по Граму Gram stain	Грам+ Gram +			

Результаты литературного обзора, проведенного авторами, показали, что штамм *Streptococcus agalactiae* является патогенным, стимулирующим развитие ряда инфекционных заболеваний (менингита, пневмонии и т. п.) [27, 28], следовательно, штамм *Streptococcus agalactiae* в качестве пробиотика использоваться не может, вследствие исключен из дальнейшего исследования.

1.2 Результаты проверки пробиотических свойств выделенных штаммов

1.2.1 Исследование антимикробной активности выделенных штаммов

Полученные в ходе анализа результаты показали (таблица 2), что все исследуемые

микроорганизмы, выделенные из ЖКТ человека, проявляли высокую антимикробную активность по отношению к используемым в опыте тест-культурам. К штамму *Escherichia coli* B-6954 наибольшую активность проявлял *Bifidobacterium bifidum*, к *Bacillus fastidiosus* B-5651 – *Lactobacillus plantarum*, к штамму *Pseudomonas fluorescens* B-3502 – *Lactobacillus fermentum*, к штамму *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 – *Streptococcus thermophilus*, к штамму *Leuconostoc mesenteroides* B-8404 – *Streptococcus thermophilus*, к штамму *Candida albicans* ATCC 885–653 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – *Streptococcus salivarius*. Исследование устойчивости выделенных штаммов к действию антибиотиков.

Таблица 2.

Антимикробная активность выделенных чистых культур из ЖКТ человека

Table 2.

Antimicrobial activity of isolated pure cultures from the human gastrointestinal tract

Тест-культуры Test cultures	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	Диаметр зон подавления роста тест-культур, мм Diameter of zones of suppression of growth of test cultures, mm						
<i>Escherichia coli</i> B-6954	37,0±1,0	28,4±1,5	27,3±1,3	26,7±1,1	29,0±1,9	34,0±1,6	33,9±1,4
<i>Bacillus fastidiosus</i> B-5651	29,1±1,3	29,8±1,9	34,1±1,6	32,0±1,3	31,8±1,6	27,7±1,6	27,7±1,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-3502	33,0±1,5	34,2±1,1	32,8±1,5	31,7±1,2	33,4±1,5	29,6±1,4	25,3±1,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	29,3±1,2	35,8±1,2	28,6±1,2	27,2±1,4	29,6±1,3	35,6±1,6	36,4±1,5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-8404	31,2±1,3	27,1±1,9	27,6±1,3	28,7±1,6	30,1±1,2	33,2±1,7	35,7±1,8
<i>Candida albicans</i> ATCC 885–653	33,5±1,6	30,0±1,6	29,0±1,4	30,0±1,8	35,2±1,5	36,4±1,5	34,2±1,7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	37,2±1,2	32,2±1,8	33,9±1,7	31,8±1,5	30,6±1,2	37,9±1,1	32,2±1,6

Полученные в ходе исследования результаты (таблица 3) свидетельствовали о том, что выделенные из ЖКТ штаммы имели различную устойчивость к действию антибиотиков. Так, штаммы *Bifidobacterium breve* и *Lactobacillus plantarum* обладали устойчивостью к действию бензилпенициллина, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* – к действию стрептомицина. Штаммами с умеренной

устойчивостью относились: *Streptococcus salivarius* – к действию бензилпенициллина; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* – к действию тетрациклина и гентамицина; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* – к действию канамицина; *Lactobacillus fermentum* – к действию хлорамфеникола.

Таблица 3.

Антибиотикорезистентность выделенных чистых культур из ЖКТ

Table 3.

Antibiotic resistance of isolated pure cultures from the gastrointestinal tract

Антибиотик Antibiotic	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
	Диаметр зон ингибирования роста, мм Diameter of growth inhibition zones, mm						
Бензилпенициллин Benzylpenicillin	36,4±1,2	3,3±0,5	14,3±0,9	29,2±1,5	33,1±1,5	18,7±0,8	34,6±1,3
Стрептомицин Streptomycin	33,3±1,7	28,1±1,3	7,5±0,5	7,7±0,6	10,8±1,0	35,1±1,9	33,1±1,5
Тетрациклин Tetracycline	27,5±1,3	32,1±1,3	18,3±1,8	19,2±1,1	20,2±1,3	23,1±1,2	34,3±1,7
Ампициллин Ampicillin	28,3 ±1,1	32,3±1,2	32,0±1,2	35,3±1,8	29,8±1,6	24,2±1,6	37,3±1,4
Канамицин Kanamycin	25,1±1,9	27,9±1,8	15,2±1,6	15,2±0,7	23,9±1,6	31,1±1,5	32,3±1,9
Хлорамфеникол Chlororamfenikol	22,8±1,3	29,1±1,2	31,2±1,9	36,1±1,2	19,9±1,8	27,3±1,6	30,9±1,9
Гентамицин Gentamicin	35,5±1,6	33,4±1,6	19,2±1,1	18,3±1,8	17,9±1,9	32,4±1,6	30,1±1,2

1.2.2 Исследование антиоксидантной активности выделенных штаммов

Результаты исследования антиоксидантной активности свидетельствовали о том, что все исследуемые микроорганизмы проявляли способность нейтрализовать свободные радикалы

(таблица 4). Антиоксидантная активность зависела от фазы роста штаммов, так восстановление реагента DPPH более интенсивно при 2 ч культивирования, чем при 7 ч и 25 ч, то есть с увеличением продолжительности роста – снижалась антиоксидантная активность.

Таблица 4.

Оптическая плотность исследуемых супернатантов, полученных при культивировании штаммов

Table 4.

Optical density of the studied supernatants obtained by cultivating the strains

Образцы Samples	Оптическая плотность (при длине волны 517 нм) Optical density (at a wavelength of 517 nm)			
	2 ч 2 h	4 ч 4 h	7 ч 7 h	25 ч 25 h
DPPH	1,78±0,09	1,78±0,09	1,78±0,09	1,78±0,09
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,05±0,06	1,07±0,06	1,10±0,07	1,13±0,08
<i>Bifidobacterium breve</i>	1,05±0,07	1,08±0,06	1,11±0,07	1,13±0,08
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,07±0,07	1,09±0,09	1,13±0,08	1,17±0,09
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1,08±0,08	1,09±0,08	1,11±0,07	1,17±0,09
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,09±0,07	1,08±0,06	1,14±0,09	1,18±0,07
<i>Streptococcus salivarius</i>	1,10±0,06	1,12±0,07	1,16±0,08	1,19±0,05
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1,10±0,05	1,14±0,07	1,18±0,08	1,21±0,09

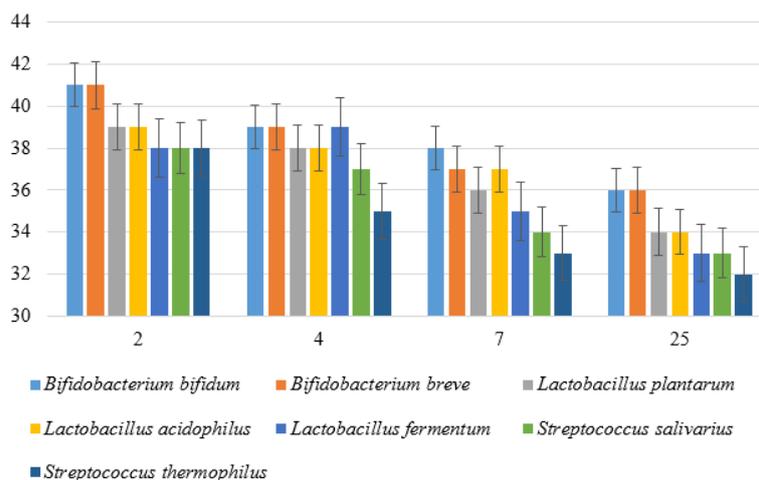


Рисунок 2. Антиоксидантная активность супернатанта штаммов, выделенных из ЖКТ человека
Figure 2. Antioxidant activity of the supernatant of strains isolated from the human gastrointestinal tract

1.2.3 Исследования противоопухолевых свойств штаммов, выделенных из ЖКТ

Результаты исследования показали (таблица 5), что все исследуемые штаммы проявляли противоопухолевое действие по отношению

к различным типам раковых клеток. Наибольшей активностью обладали штаммы *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus*.

Таблица 5.

Противоопухолевое действие исследуемых штаммов различной концентрации на жизнеспособность ряда раковых клеток

Table 5.

Antitumor effect of the studied strains of various concentrations on a number of cancer cells

Концентрация микроорганизмов, КОЕ/мл Concentration microorganisms, CFU/ml	Клеточная линия Cell line					
	НepG2	ЛБР2	MDA-MB-231	MCF-7	U87	Panc-1
Количество жизнеспособных клеток, % The number of viable cells, %						
<i>Bifidobacterium bifidum</i>						
10 ⁵	98,3±0,9	87,2±1,6	79,1±1,1	92,2±1,2	90,3±1,5	80,3±1,3
10 ⁷	58,1±0,8	43,5±1,7	39,2±1,3	50,3±1,8	52,8±1,6	38,9±1,1
<i>Bifidobacterium breve</i>						
10 ⁵	63,2±0,5	63,9±0,9	55,2±0,2	65,2±0,4	71,2±1,1	58,2±1,6
10 ⁷	32,6±0,7	33,2±0,2	29,1±0,5	34,2±0,6	39,2±1,2	30,2±1,1
<i>Lactobacillus plantarum</i>						
10 ⁵	56,2±0,9	52,1±0,7	60,9±1,5	61,1±0,8	58,3±0,7	65,1±1,2
10 ⁷	31,3±0,5	26,5±1,2	32,1±1,9	28,4±0,8	28,8±1,1	32,1±0,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>						
10 ⁵	60,9±0,8	76,1±0,9	71,2±0,9	74,1±1,0	61,1±0,7	59,1±0,4
10 ⁷	16,1±0,3	33,2±0,4	19,1±0,5	22,0±0,9	19,9±1,1	23,2±0,5
<i>Lactobacillus fermentum</i>						
10 ⁵	87,1±1,2	99,1±1,2	68,2±0,8	78,1±1,2	87,2±1,6	91,9±1,4
10 ⁷	36,3±0,6	50,9±0,9	33,4±1,1	35,4±0,9	45,3±0,7	49,3±0,5
<i>Streptococcus salivarius</i>						
10 ⁵	81,1±1,3	92,9±1,4	75,2±1,1	83,9±1,0	77,2±1,3	73,2±1,2
10 ⁷	42,1±0,7	50,1±0,8	38,5±0,5	45,0±0,2	36,1±0,4	40,0±0,2
<i>Streptococcus thermophilus</i>						
10 ⁵	87,9±0,9	90,3±0,2	95,5±0,3	93,1±1,2	65,9±1,5	79,2±0,8
10 ⁷	45,5±0,2	47,9±1,3	57,0±0,2	65,2±0,9	48,2±1,2	43,5±0,5

1.2.4 Исследования устойчивости выделенных штаммов к неблагоприятным условиям ЖКТ

Результаты исследования (таблица 6) свидетельствовали о том, что штаммы исследуемых

культур не теряли свою жизнеспособность при воздействии сред с низкими значениями рН и желчи различной концентрации в течение 2 ч.

Таблица 6.
Устойчивость исследуемых штаммов к различным значениям pH желчи различной концентрации
Table 6.

Resistance of the studied strains to different pH values of bile of different concentrations

Образцы Samples	Выживаемость клеток (%) при различном pH Cell survival (%) at different pH											
	30 мин 30 mins			60 мин 60 mins			90 мин 90 mins			120 мин 120 mins		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	60,2 ±0,2	72,3 ±0,1	83,2 ±0,5	52,3 ±0,4	65,4 ±0,3	75,3 ±0,5	48,8 ±0,3	62,1 ±0,6	70,8 ±0,2	43,2 ±0,7	59,3 ±0,7	62,4 ±0,9
<i>Bifidobacterium breve</i>	71,2 ±0,8	86,4 ±0,3	98,2 ±0,2	65,0 ±0,9	81,6 ±0,2	90,9 ±0,4	60,8 ±0,1	74,9 ±0,3	85,8 ±0,3	55,1 ±1,1	64,9 ±0,2	79,8 ±0,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	72,0 ±0,2	85,3 ±0,7	96,1 ±0,3	66,3 ±0,2	79,5 ±0,6	89,9 ±0,1	64,3 ±0,6	75,9 ±0,1	85,1 ±0,6	60,3 ±0,8	73,9 ±0,3	80,8 ±0,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	73,1 ±1,2	87,6 ±0,3	97,1 ±0,9	70,3 ±0,8	82,1 ±0,3	94,1 ±0,9	67,2 ±0,1	79,3 ±0,5	89,3 ±0,4	60,1 ±1,1	74,1 ±0,9	81,3 ±1,2
<i>Lactobacillus fermentum</i>	70,2 ±0,8	80,4 ±0,5	92,2 ±0,2	65,3 ±0,5	69,1 ±0,8	75,9 ±0,4	89,9 ±0,2	63,9 ±0,9	85,8 ±0,3	55,1 ±1,1	64,9 ±0,2	79,8 ±0,5
<i>Streptococcus salivarius</i>	70,2 ±0,5	81,1 ±0,2	91,2 ±0,5	64,9 ±0,5	79,2 ±0,6	85,9 ±0,2	60,2 ±0,9	70,1 ±0,6	80,1 ±0,2	59,3 ±0,5	66,7 ±0,6	75,9 ±0,2
<i>Streptococcus thermophilus</i>	75,1 ±1,6	88,2 ±0,8	93,9 ±0,2	72,1 ±0,2	85,3 ±0,6	89,9 ±0,2	68,1 ±0,6	70,9 ±0,1	82,4 ±0,9	65,3 ±0,9	70,1 ±0,5	75,9 ±1,3
Выживаемость клеток (%) при различной концентрации желчи Cell survival (%) in the assimilation of bile												
Образцы Samples	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	70,2 ±0,3	80,3 ±0,2	93,2 ±0,5	68,1 ±0,6	78,6 ±0,4	90,1 ±0,1	65,6 ±0,2	72,1 ±0,3	84,9 ±0,6	61,2 ±0,6	68,9 ±0,1	70,1 ±0,1
<i>Bifidobacterium breve</i>	70,6 ±0,1	82,1 ±0,3	91,9 ±0,2	68,9 ±0,2	79,2 ±0,6	89,5 ±0,6	64,9 ±0,3	75,6 ±0,4	85,7 ±0,4	60,1 ±0,1	71,1 ±0,2	80,9 ±0,3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	73,4 ±0,6	87,1 ±0,2	97,2 ±0,1	70,1 ±0,3	84,1 ±0,2	95,3 ±0,2	67,9 ±0,1	80,2 ±0,6	90,5 ±0,3	63,2 ±0,1	78,3 ±0,1	86,9 ±0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	70,6 ±0,6	85,2 ±0,1	93,1 ±0,2	68,9 ±0,1	80,1 ±0,1	90,2 ±0,1	62,1 ±0,3	78,1 ±0,1	89,1 ±0,3	60,1 ±0,1	74,3 ±0,2	84,9 ±1,0
<i>Lactobacillus fermentum</i>	73,5 ±0,2	85,9 ±0,1	98,1 ±1,1	71,0 ±0,1	83,5 ±0,1	94,9 ±0,1	69,1 ±0,2	80,4 ±0,2	90,1 ±0,1	66,0 ±0,6	77,9 ±0,2	87,2 ±0,5
<i>Streptococcus salivarius</i>	70,0 ±0,2	80,0 ±0,6	90,6 ±0,4	65,9 ±0,2	75,6 ±0,4	87,1 ±0,3	62,6 ±0,2	70,1 ±0,1	82,1 ±0,1	60,1 ±0,1	67,2 ±0,1	77,2 ±0,1
<i>Streptococcus thermophilus</i>	70,6 ±0,2	82,6 ±0,2	93,0 ±0,6	69,1 ±0,5	80,1 ±0,1	89,9 ±0,9	65,9 ±0,1	68,1 ±0,1	78,9 ±0,9	63,4 ±0,5	67,1 ±0,2	74,9 ±0,2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	70,2 ±0,3	80,3 ±0,2	93,2 ±0,5	68,1 ±0,6	78,6 ±0,4	90,1 ±0,1	65,6 ±0,2	72,1 ±0,3	84,9 ±0,6	61,2 ±0,6	68,9 ±0,1	70,1 ±0,1

1.3 Результаты разработки консорциумов и изучения их пробиотических свойств

1.3.1 Анализ биосовместимости исследуемых штаммов

Результаты исследования показали (таблица 7), что анализируемые микроорганизмы проявляли необходимые свойства для того, чтобы их можно было использовать в качестве пробиотиков. К тому же, наличие биосовместимости различных штаммов позволяло создавать на их основе пробиотические консорциумы, использование которых актуально для профилактики возникновения канцерогенеза.

Таблица 7.
Биосовместимость исследуемых штаммов, выделенных из ЖКТ человека

Table 7.
Biocompatibility of the studied strains isolated from the human gastrointestinal tract

Штамм Strain	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>B. bifidum</i>		+	+	+	+	±	±
<i>B. breve</i>	+		+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i>	+	+		+	+	±	±
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+		±	-	-
<i>L. fermentum</i>	+	+	+	±		+	+
<i>S. salivarius</i>	±	+	±	-	+		+
<i>S. thermophilus</i>	±	+	±	-	+	+	

«+» – биосовместимы, «-» – бионесовместимы, «±» – слабый антагонизм, «+» – сильный антагонизм | «+» – biocompatible, «-» – bio-incompatible, «±» – weak antagonism, «+» – strong antagonism

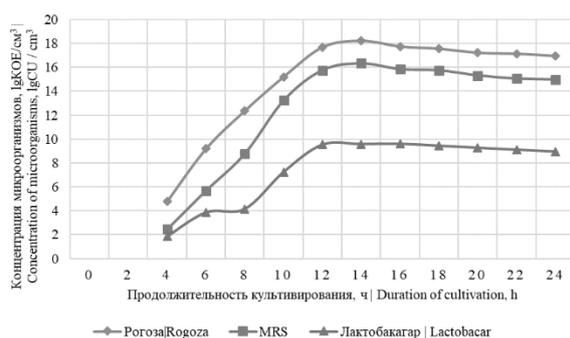
1.3.2 Разработка консорциума из выделенных штаммов

На основании данных о биосовместимости были выбраны консорциумы следующего состава:

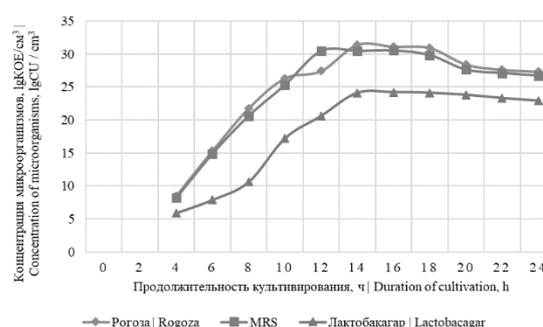
- № 1: *Bifidobacterium bifidum* + *Bifidobacterium breve* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus acidophilus* (1:1:1:1);
- № 2: *Bifidobacterium bifidum* + *Bifidobacterium breve* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus fermentum* (1:1:1:1);
- № 3: *Bifidobacterium breve* + *Lactobacillus fermentum* + *Streptococcus salivarius* (1:1:1);

- № 4: *Bifidobacterium breve* + *Lactobacillus fermentum* + *Streptococcus thermophiles* (1:1:1).

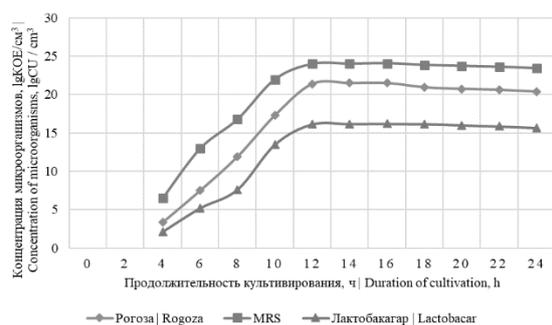
Осуществлялся подбор питательной среды для максимального накопления биомассы и дальнейшего хранения консорциумов путем исследования прироста биомасс (рисунок 2). Результаты свидетельствовали о том, что наибольший прирост клеточной биомассы консорциумов № 1 и № 2 наблюдался на питательной среде Рогоза, а № 3 и № 4 на среде MRS, в результате данные среды целесообразно использовать и для дальнейшего хранения смеси штаммов.



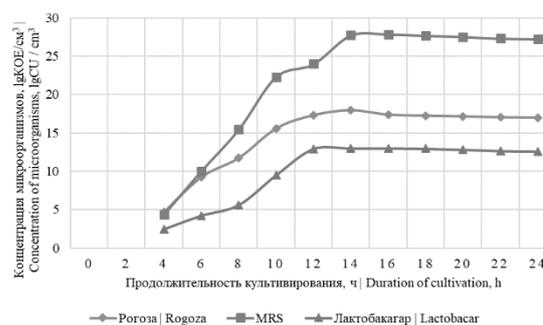
(a)



(b)



(c)



(d)

Рисунок 2. Прирост биомассы консорциумов при культивировании на различных питательных средах: (а) культивирование консорциума № 1; (б) культивирование консорциума № 2; (с) культивирование консорциума № 3; (д) культивирование консорциума № 4

Figure 2. Increase in the biomass of consortia when cultivated on various nutrient media: (a) cultivation of consortium № 1; (b) cultivation of consortium № 2; (c) cultivation of consortium № 3; (d) cultivation of consortium № 4

Для того чтобы оценить пригодность выбранных консорциумов в качестве пробиотиков необходимо определить наличие антимикробной активности, устойчивости к действию антибиотиков, антиоксидантной активности, противоопухолевых свойств и устойчивости к действию желчи и кислот.

1.3.3 Определение пробиотических свойств консорциумов

1.3.3.1 Антимикробная активность консорциумов

Результаты исследования показали (таблица 8), что все исследуемые консорциумы

проявляли высокую антимикробную активность по отношению к патогенным и условно-патогенным тест-культурам. Так, наибольшую активность к штаммам *Escherichia coli* B-6954, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885–653 проявлял консорциум № 2, к штаммам *Bacillus fastidiosus* B-5651 и *Leuconostoc mesenteroides* B-8404 консорциум № 1, к штамму *Pseudomonas fluorescens* B-3502 консорциум № 3, к штамму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 консорциум № 4.

Таблица 8.
Антимикробная активность консорциумов
Table 8.
Antimicrobial activity of consortia

Тест-культуры Test cultures	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
	Диаметр зон подавления роста тест-культур, мм Diameter of zones of suppression of growth of test cultures, mm			
<i>Escherichia coli</i> B-6954	38,2 ±1,2	38,7 ±1,9	24,4 ±1,1	26,8 ±1,3
<i>Bacillus fastidiosus</i> B-5651	33,1 ±1,3	32,5 ±1,2	30,1 ±1,1	31,4 ±1,2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-3502	30,6 ±1,1	30,1 ±1,4	33,8 ±1,1	32,9 ±1,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	28,1 ±1,3	32,4 ±1,1	27,5 ±1,4	27,9 ±1,3
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-8404	35,3 ±1,2	34,8 ±1,1	35,2 ±1,8	30,7 ±1,2
<i>Candida albicans</i> ATCC 885–653	31,4 ±1,4	32,0 ±1,1	28,7 ±1,1	30,0 ±1,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	34,5 ±1,2	31,2 ±1,6	35,1 ±1,1	37,1 ±1,3

1.3.3.2 Антибиотикорезистентность консорциумов

Результаты анализа свидетельствовали о том (таблица 9), что консорциумы имели различную устойчивость к действию антибиотиков. Консорциум № 1 и № 2 чувствительны к действию ампициллина, но умеренно устойчивы к действию всех других антибиотиков. Консорциум № 3 обладал умеренной устойчивостью к действию бензилпенициллина и тетрациклина, а консорциум № 4 только умеренную устойчивость к действию тетрациклина.

Таблица 9.
Антибиотикорезистентность консорциумов
Table 9.

Антибиотик Antibiotic	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
	Диаметр зон ингибирования роста, мм Diameter of growth inhibition zones, mm			
Бензилпенициллин Benzylpenicillin	18,9 ±1,8	19,3 ±1,6	20,8 ±1,7	23,2 ±1,5
Стрептомицин Streptomycin	20,8 ±1,1	20,1 ±1,7	27,1 ±0,5	25,7 ±0,7
Тетрациклин Tetracycline	20,4 ±1,9	20,3 ±1,5	20,9 ±0,8	20,9 ±0,1
Ампициллин Ampicillin	32,1 ±1,4	32,1 ±1,1	32,0 ±1,4	33,3 ±1,2
Канамицин Kanamycin	20,9 ±0,1	20,3 ±1,5	24,1 ±1,8	27,1 ±1,1
Хлорамфеникол Chloropamfenikol	20,8 ±1,4	20,9 ±0,2	21,2 ±1,6	22,3 ±1,4
Гентамицин Gentamicin	20,1 ±1,7	20,0 ±1,4	21,1 ±0,9	23,1 ±1,1

1.3.3.3 Антиоксидантная активность консорциумов
Результаты свидетельствовали о том (таблица 10, рисунок 3), что все исследуемые консорциумы обладали антиоксидантной активностью.

Таблица 10.
Оптическая плотность исследуемых супернатантов
Table 10.

Образцы Samples	Оптическая плотность (при длине волны 517 нм) Optical density (at a wavelength of 517 nm)			
	2 ч 2 h	4 ч 4 h	7 ч 7 h	25 ч 25 h
DPPH	1,78± 0,09	1,78± 0,09	1,78± 0,09	1,78± 0,09
№ 1	1,13± 0,09	1,26± 0,10	1,40± 0,10	1,57± 0,29
№ 2	1,12 ±0,08	1,25± 0,08	1,38± 0,53	1,54± 0,21
№ 3	1,23± 0,12	1,31± 0,192	1,52± 0,39	1,72± 0,21
№ 4	1,25± 0,10	1,33± 0,12	1,55± 0,42	1,73± 0,19

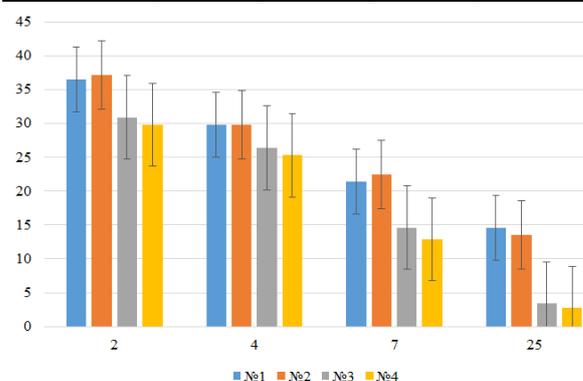


Рисунок 3. Антиоксидантная активность супернатанта консорциумов

Figure 3. Antioxidant activity of consortium supernatant

Результаты также показали, что с увеличением продолжительности роста – снижалась антиоксидантная активность. Наибольшей антиоксидантной активностью обладал консорциум № 1.

1.3.3.4 Противоопухолевые свойства консорциумов

По результатам исследования видно (таблица 11), что все исследуемые консорциумы проявляли противоопухолевое действие по отношению к раковым клеткам (HepG2, ЛБР2, MDA-MB-231, MCF-7, U87, Panc-1). Наибольшей активностью обладал консорциум № 4.

1.3.3.5 Устойчивость консорциумов к кислотам и желчи

Результаты свидетельствовали о том (таблица 12), что исследуемые консорциумы не теряли свою жизнеспособность при низких значениях pH и при воздействии желчи различной концентрации в течение 2 ч. Наибольшую устойчивость за рассматриваемый промежуток времени проявлял консорциум № 2

Таблица 11.

Противоопухолевое действие исследуемых консорциумов различной концентрации на жизнеспособность ряда раковых клеток

Table 11.

Antitumor effect of the studied consortia of various concentrations on a number of cancer cells

Концентрация микроорганизмов, КОЕ/мл Concentration microorganisms, CFU/ml	Клеточная линия Cell line					
	HepG2	ЛБП2	MDA-MB-231	MCF-7	U87	Панс-1
Количество жизнеспособных клеток, % The number of viable cells, %						
№ 1						
10 ⁵	64,3±1,4	79,4±1,8	73,5±1,7	77,2±2,1	63,4±1,4	61,4±1,8
10 ⁷	16,5±1,0	34,7±1,5	19,4±1,1	22,3±1,6	20,8±1,2	25,3±1,3
№ 2						
10 ⁵	89,3±1,4	85,2±1,5	75,3±2,2	80,1±2,4	91,5±1,7	96,2±1,6
10 ⁷	35,9±2,7	54,6±1,7	34,1±1,5	36,2±1,6	49,2±0,9	51,2±2,1
№ 3						
10 ⁵	64,5±1,1	85,4±1,1	70,2±1,2	71,3±2,3	60,1±1,5	62,5±1,2
10 ⁷	14,3±1,7	37,2±1,6	25,2±2,1	21,5±1,7	21,3±1,4	23,2±1,1
№ 4						
10 ⁵	60,5±2,4	69,9±2,8	70,4±1,8	74,4±2,7	62,1±1,1	59,9±1,8
10 ⁷	12,5±2,6	27,5±1,9	15,9±1,7	25,7±1,1	20,1±1,3	23,1±0,9

Таблица 12.

Устойчивость исследуемых консорциумов к рН и желчи

Table 12.

Resistance of the studied consortia to pH and bile

Образцы Samples	Выживаемость клеток (%) при различном рН Cell survival (%) at different pH											
	30 мин 30 mins			60 мин			30 мин 30 mins			120 мин 120 mins		
	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4	pH2	pH3	pH4
№ 1	72,8 ±1,2	86,7 ±0,2	95,1 ±0,7	67,8 ±0,6	82,2 ±0,3	88,6 ±0,9	64,5 ±0,3	73,6 ±0,5	80,9 ±0,2	62,7 ±0,5	72,4 ±0,4	76,9 ±1,6
№ 2	68,2 ±0,8	82,1 ±0,1	92,8 ±0,2	62,5 ±0,5	76,4 ±0,3	85,2± 0,5	58,8 ±0,1	72,5 ±0,2	82,2 ±0,5	52,9 ±0,1	66,4 ±0,5	74,4 ±0,4
№ 3	70,6 ±0,2	79,3 ±0,5	95,6 ±0,2	64,1 ±0,7	75,5 ±0,2	83,4 ±0,3	75,8 ±0,3	74,9 ±0,1	83,4 ±0,3	65,1 ±0,1	64,9 ±0,3	73,2 ±0,9
№ 4	72,2 ±1,1	85,1 ±0,3	94,6 ±0,9	67,4 ±0,8	78,7 ±0,1	85,6 ±0,8	72,3 ±0,2	65,9 ±0,9	84,6 ±0,2	58,5 ±0,3	66,7 ±0,7	72,1 ±1,1
Выживаемость клеток (%) при различной концентрации желчи Cell survival (%) in the assimilation of bile												
Образцы Samples	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%	0,3%	0,5%	1,0%
№ 1	70,4 ±0,1	81,4 ±0,5	94,3 ±0,4	69,2 ±0,1	78,9 ±0,2	93,2 ±0,4	66,1 ±0,3	75,1 ±0,8	89,1 ±0,1	61,3 ±0,4	71,0 ±0,9	83,1 ±0,9
№ 2	74,7 ±0,6	86,7 ±0,2	98,1 ±1,1	73,2 ±0,7	83,6 ±0,5	94,2 ±0,6	69,9 ±0,4	79,9 ±0,1	90,2 ±0,2	66,2 ±0,3	75,3 ±0,1	86,9 ±0,4
№ 3	72,8 ±0,3	83,2 ±0,4	94,2 ±0,4	69,3 ±0,5	80,1 ±0,1	90,8 ±0,6	65,4 ±0,5	77,1 ±0,6	87,3 ±0,1	62,5 ±0,5	71,2 ±0,4	82,3 ±0,5
№ 4	72,2 ±0,1	86,3 ±0,2	95,1 ±0,3	69,1 ±0,3	81,3 ±0,5	91,3 ±0,1	66,7 ±0,4	78,2 ±0,3	89,4 ±0,2	63,1 ±0,4	72,3 ±0,6	85,1 ±0,3
№ 1	70,4 ±0,1	81,4 ±0,5	94,3 ±0,4	69,2 ±0,1	78,9 ±0,2	93,2 ±0,4	66,1 ±0,3	75,1 ±0,8	89,1 ±0,1	61,3 ±0,4	71,0 ±0,9	83,1 ±0,9

Хранение консорциумов осуществлялось с помощью сублимационного высушивания по методике, описанной в материалах и методах.

Обсуждение

В ходе данной работы составлены консорциумы из штаммов, выделенных из ЖКТ здорового человека. Выделенные микроорганизмы были идентифицированы как *Bifidobacterium bifidum*,

Bifidobacterium breve, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*. Данные штаммы, как и консорциумы на их основе, обладали антимикробной, антиоксидантной активностью, проявляли противоопухолевое действие, устойчивость к действию антибиотиков и негативным условиям ЖКТ (к желчи и кислой среде).

По результатам литературного обзора установлено, что в основном учеными разрабатываются пробиотические консорциумы, в состав которых входят штаммы рода *Lactobacillus* [15, 16]. Авторами данной работы разработаны консорциумы, помимо *Lactobacillus*, включающие в себя штаммы рода *Bifidobacterium* и *Streptococcus*: №1 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, №2 – *B. bifidum*, *B. breve*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, №3 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. salivarius*, №4 – *B. breve*, *L. fermentum*, *S. thermophiles*. Такие консорциумы проявляли более активные пробиотические свойства. Антимикробную активность к наибольшему количеству патогенных и условно-патогенных тест-культур проявлял консорциум № 2. Умеренную устойчивость к наибольшему числу антибиотиков проявляли консорциумы № 1 и № 2. Наибольшей антиоксидантной активностью обладал консорциум № 1. Наиболее выраженными противораковыми свойствами в концентрации 10^7 по отношению к клеткам HerG2, ЛБР2, MDA-MB-231, U87 и Рапс-1 обладал консорциум № 4, а к MCF-7 – № 3. Наибольшую устойчивость к средам с низкой кислотностью и желчи проявлял консорциум № 2. Благодаря наличию таких свойств штаммы и консорциумы на их основе можно использовать в качестве пробиотиков для профилактики онкологических заболеваний.

Недостатком данной работы является отсутствие исследований качественного и количественного состава микробных метаболитов, а также клинических испытаний для подтверждения эффективности разработанных пробиотиков. Авторы данной работы планируют в дальнейшем устранить обозначенные ограничения,

а также разработать рецептуру и технологическую схему функционального продукта питания на основе разработанных консорциумов.

Заключение

По данным ВОЗ онкологические заболевания занимают лидирующие позиции по смертности населения, в результате чего актуальна разработка профилактических мероприятий, антиканцерогенной направленности [29]. Систематическое употребление пробиотических средств, в виде биологически активных добавок и /или пробиотических, синбиотических продуктов питания – может является важной составляющей противораковой терапии, так как пробиотики участвуют в нормализации работы микрофлоры ЖКТ, функционирование которой напрямую влияет на состояние здоровья человека, на возникновение воспалительных, канцерогенных и прочих процессов.

В данной работе представлен алгоритм разработки индивидуального пробиотического консорциума, который включал в себя выделение и идентификацию микроорганизмов ЖКТ, проверку их пробиотических свойств, подбор соотношений штаммов консорциумов, проверку их активности. Данный алгоритм может в дальнейшем использоваться в качестве начального этапа для создания индивидуальных молочнокислых продуктов питания, имеющих противораковые свойства.

Благодарности

Авторы выражают благодарность ФГБУ «Кемеровская МВЛ» за предоставление патогенных и условно-патогенных штаммов. Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ при государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2694.2020.4).

Литература

- 1 Корниенко Е.А. Микробиота кишечника как ключевой фактор формирования иммунитета и толерантности. Возможности пробиотиков // Медицинский совет. 2020. № 10. С. 92–100. doi: 10.21518/2079–701X-2020–10–92–100
- 2 Badgeley A., Anwar H., Modi K., Murphy P., Lakshmikuttyamma A. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives // Reviews on Cancer. 2021. V. 1875. № 1. doi: 10.1016/j.bbcancer.2020.188494
- 3 Morkūnas E., Skiecevičienė J., Kupčinskas J. The impact of modulating the gastrointestinal microbiota in cancer patients // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2020. V. 48–49. P. 101700. doi: 10.1016/j.bpg.2020.101700
- 4 Gori S., Inno A., Belluomini L., Bocus P. et al. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2019. V. 143. P. 139–147. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.09.003
- 5 Малихова О.А., Карасев И.А., Давыдкина Т.С., Верещак В.В. и др. Кишечный микробиом и колоректальный рак. Обзор литературы // Поволжский онкологический вестник. 2019. Т. 10. № 4 (41). С. 45–51.
- 6 Мулендеев С.В., Соловьёв И.А., Шостка К.Г., Арутюнян К.В. и др. Роль дисбиоза кишечника в этиологии и профиликтике колоректального рака // Профилактическая и клиническая медицина. 2017. № 4 (65). С. 55–60.
- 7 Mego M., Holec V., Drgona L., Hainova K. et al. Probiotic bacteria in cancer patients un-dergoing chemotherapy and radiation therapy // Complementary Therapies in Medicine. 2013. V. 21. I. 6. P. 712–723. doi: 10.1016/j.ctim.2013.08.018

- 8 Markowiak P., Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health // *Nutrients*. 2017. № 9 (9). P. 1021. doi: 10.3390/nu9091021
- 9 Домотенко Л.В., Шепелин А.П. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидобактерий // *Инфекция и иммунитет*. 2014. № 4(3). С. 279–283. doi: 10.15789/2220–7619–2014–3–279–283
- 10 Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Детушев К.В. Сравнительные испытания лактобакагара и MRS агара // *Курский научно-практический вестник человек и его здоровье*. 2014. № 4. С. 5–10.
- 11 de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *J Appl Bacteriol*. 1960. № 23. P. 130–135.
- 12 ГОСТ 10444.11–89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. Продукты пищевые, консервы. Методы микробиологического анализа. М.: Стандартинформ, 2010.
- 13 ГОСТ Р 56139–2014 Продукты пищевые специализированные и функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов (с Изменением № 1). М.: Стандартинформ, 2015. URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115455>
- 14 Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume three. The Firmicutes – Springer Science+Business Media. 2009. P. 1422.
- 15 Davoodabadi A., Dallal M.M., Foroushani A.R., Douraghi M. Harati F.A. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria // *Anaerobe*. 2015. № 34. P. 53–58. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.014.
- 16 Jomehzadeh N., Javaherizadeh H., Amin M., Saki M. et al. Isolation and identification of potential probiotic *Lactobacillus* species from feces of infants in southwest Iran // *International Journal of Infectious Diseases*. 2020. V. 96. P. 524–530. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.034
- 17 Yang Y., Babich O., Sukhikh S, Zimina M. et al. Antibiotic activity and resistance of lactic acid bacteria and other antagonistic bacteriocin-producing microorganisms // *Foods and Raw Materials*. 2020. V. 8. № 2. P. 377–384. doi: 10.21603/2308–4057–2020–2–377–384
- 18 Hashemi S.M., Shahidi F., Mortazavi S.A., Milani E. et al. Potentially probiotic *Lactobacillus* strains from traditional Kurdish cheese // *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014. № 6. P. 22–31. doi: 10.1007/s12602–014–9155–5
- 19 Pyrzynska K., Pełal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples (Review) // *Anal. Methods*. 2013. № 5. P. 4288–4295. doi: 10.1039/C3AY40367J
- 20 Карамовой Н.С., Хабибуллина Р.Э. Антирадикальные свойства *Lactobacillus acidophilus* n.v. *Ep.* 317/402 in vitro // *Вестник Казанского технологического университета*. 2013. № 23. С. 127–129. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20916564>
- 21 Мальцева Е.М., Егорова Н.О., Егорова И.Н., Мухамадияров Р.А. Антиоксидантная и антирадикальная активность in vitro экстрактов травы *Sanguisorba officinalis* L., собранной в различные фазы развития // *МвК*. 2017. Т. 16. № 2. С. 32–37.
- 22 Бабич О.О., Асякина Л.К., Шишин М.В. Методика определения цитотоксических свойств микроорганизмов, выделенных из желудочно-кишечного тракта человека // *Современная наука: тенденции развития*. 2016. № 13. С. 146–150.
- 23 Sharma A., Lavania M., Singh R., Lal B. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk // *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.062
- 24 Волкова Г.С., Куксова Е.В., Серба Е.М. Изучение биологических межштаммовых взаимодействий и ростовых свойств производственных штаммов молочнокислых бактерий // *Актуальные вопросы молочный промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством*. 2020. Т. 1. № 1(1). С. 104–109.
- 25 Нетрусов, А.И., Котова, И.Б. *Микробиология*. М.: ИЦ «Академия», 2012. 384 с.
- 26 Пат. № 2200566, RU, А61К 35/74. Способ получения лактобактерина. Несчислаев В.А., Фадеева И.В. № 2001121098/14; Заявл. 26.07.2001; Опубл. 20.03.2003, Бюл. № 8.
- 27 Paveenkittiporn W., Ungcharoen R., Kerdsin A. Streptococcus agalactiae infections and clinical relevance in adults, Thailand // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2020. V. 97. № 1. P. 115005. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115005
- 28 Fujita H., Nakamura I., Tsukimori A., Sato A. et al. Severe infective endocarditis in a healthy adult due to *Streptococcus agalactiae* // *International Journal of Infectious Diseases*. 2015. V. 38. P. 43–45. doi: 10.1016/j.ijid.2015.07.009
- 29 Информация и статистика. URL: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics>

References

- 1 Kornienko E.A. Intestinal microbiota as a key factor in the formation of immunity and tolerance. Possibilities of probiotics. *Medical Council*. 2020. no. 10. pp. 92–100. doi: 10.21518/2079–701X 2020–10–92–100 (in Russian).
- 2 Badgeley A., Anwar H., Modi K., Murphy P., Lakshmikuttyamma A. Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. *Reviews on Cancer*. 2021. vol. 1875. no. 1. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188494
- 3 Morkūnas E., Skiecevičienė J., Kupčinskas J. The impact of modulating the gastrointestinal microbiota in cancer patients. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2020. vol. 48–49. pp. 101700. doi: 10.1016/j.bpg.2020.101700
- 4 Gori S., Inno A., Belluomini L., Bocus P. et al. Gut microbiota and cancer: How gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019. vol. 143. pp. 139–147. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.09.003

- 5 Malikhova O.A., Karasev I.A., Davydkina T.S., Vereshchak V.V. et al. Gut microbiome and colorectal cancer. Literature review. Povolzhsky oncological bulletin. 2019. vol. 10. no. 4 (41). pp. 45-51. (in Russian).
- 6 Mulendeev S.V., Solovyov I.A., Shostka K.G., Arutyunyan K.V. et al. The role of intestinal dysbiosis in the etiology and prophylaxis of colorectal cancer. Preventive and clinical medicine. 2017. no. 4 (65). pp. 55-60. (in Russian).
- 7 Mego M., Holec V., Drgona L., Hainova K. et al. Probiotic bacteria in cancer patients un-dergoing chemotherapy and radiation therapy. Complementary Therapies in Medicine. 2013. vol. 21. no. 6. pp. 712–723. doi: 10.1016/j.ctim.2013.08.018
- 8 Markowiak P., Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. Nutrients. 2017. no. 9 (9). pp. 1021. doi: 10.3390/nu9091021
- 9 Domotenko L.V., Shepelin A.P. Bifidum medium for isolation and cultivation of bifidobacteria. Infection and immunity. 2014. no. 4 (3). pp. 279-283. doi: 10.15789/2220–7619–2014–3–279–283 (in Russian).
- 10 Domotenko L.V., Shepelin A.P., Detushev K.V. Comparative tests of lactobacillus and MRS agar. Kursk scientific and practical bulletin man and his health. 2014. no. 4. pp. 5–10. (in Russian).
- 11 de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol. 1960. no. 23. pp. 130–135.
- 12 GOST 10444.11–89 Food products. Methods for the determination of lactic acid microorganisms. Food products, canned food. Microbiological analysis methods. Moscow, Standartinform, 2010. (in Russian).
- 13 GOST R 56139–2014 Specialized and functional food products. Methods for determination and counting of probiotic microorganisms (with Amendment No. 1). Moscow, Standartinform, 2015. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200115455> (in Russian).
- 14 Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume three. The Firmicutes – Springer Science+Business Media. 2009. pp. 1422.
- 15 Davoodabadi A., Dallal M.M., Foroushani A.R., Douraghi M. Harati F.A. Antibacterial activity of Lactobacillus spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. Anaerobe. 2015. no. 34. pp. 53–58. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.014.
- 16 Jomehzadeh N., Javaherizadeh H., Amin M., Saki M. et al. Isolation and identification of potential probiotic Lactobacillus species from feces of infants in southwest Iran. International Journal of Infectious Diseases. 2020. vol. 96. pp. 524–530. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.034
- 17 Yang Y., Babich O., Sukhikh S, Zimina M. et al. Antibiotic activity and resistance of lactic acid bacteria and other antagonistic bacteriocin-producing microorganisms. Foods and Raw Materials. 2020. vol. 8. no. 2. pp. 377–384. doi: 10.21603/2308–4057–2020–2–377–384
- 18 Hashemi S.M., Shahidi F., Mortazavi S.A., Milani E. et al. Potentially probiotic Lactobacillus strains from traditional Kurdish cheese. Probiotics Antimicrob Proteins. 2014. no. 6. pp. 22–31. doi: 10.1007/s12602–014–9155–5
- 19 Pyrzynska K., Pękal A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples (Review). Anal. Methods. 2013. no. 5. pp. 4288–4295. doi: 10.1039/C3AY40367J
- 20 Karamova N.S., Khabibullina R.E. Anti-radical properties of Lactobacillus acidophilus n.v. Ep. 317/402 in vitro // Bulletin of Kazan Technological University. 2013. no. 23. pp. 127–129. Available at: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=20916564> (in Russian).
- 21 Maltseva E.M., Egorova N.O., Egorova I.N., Mukhamadiyarov R.A. Antioxidant and antiradical activity in vitro of extracts of the herb Sanguisorba officinalis L. collected in different phases of development. MvK. 2017. vol. 16. no. 2. pp. 32–37. (in Russian).
- 22 Babich O.O., Asyakina L.K., Shishin M.V. Method for determining the cytotoxic properties of microorganisms isolated from the human gastrointestinal tract. Modern science: development trends. 2016. no. 13. pp. 146–150. (in Russian).
- 23 Sharma A., Lavania M., Singh R., Lal B. Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. Saudi Journal of Biological Sciences. 2020. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.11.062
- 24 Volkova G.S., Kuksova E.V., Serba E.M. Study of biological interactions between strains and growth properties of industrial strains of lactic acid bacteria. Actual problems of the dairy industry, intersectoral technologies and quality management systems. 2020. vol. 1. no. 1 (1). pp. 104-109. (in Russian).
- 25 Netrusov, A.I., Kotova, I.B. Microbiology. Moscow, ITs "Academy", 2012. 384 p. (in Russian).
- 26 Neschislyayev V.A., Fadeeva I.V. Method for producing lactobacterin. Patent RF, no. 2200566, 2003.
- 27 Paveenkittiporn W., Ungcharoen R., Kerdsin A. Streptococcus agalactiae infections and clinical relevance in adults, Thailand. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2020. vol. 97. no. 1. pp. 115005. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115005
- 28 Fujita H., Nakamura I., Tsukimori A., Sato A. et al. Severe infective endocarditis in a healthy adult due to Streptococcus agalactiae. International Journal of Infectious Diseases. 2015. vol. 38. pp. 43–45. doi: 10.1016/j.ijid.2015.07.009
- 29 Information and statistics. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics> (in Russian).

Сведения об авторах

Анна Д. Веснина аспирант, технологический институт пищевой промышленности, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, koledockop1@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4552-7418>

Александр Ю. Просеков д.т.н., профессор, кафедра бионанотехнологии, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, aprosekov@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Оксана В. Козлова д.т.н., доцент, технологический институт пищевой промышленности, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, ms.okvk@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2960-0216>

Марина Г. Курбанова д.т.н., кафедра технологии продуктов питания животного происхождения, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, kurbanova-mg@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0563-1007>

Евгения А. Козленко аспирант, технологический институт пищевой промышленности, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, evgenia_09.01@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6708-5964>

Юлия В. Голубцова д.т.н., профессор, кафедра технологии и организации общественного питания, Кемеровский государственный университет, ул. Красная, 6, г. Кемерово, 650000, Россия, op.kemsu@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2958-4172>

Вклад авторов

Анна Д. Веснина, Марина Г. Курбанова написание рукописи, ответственность за плагиат

Александр Ю. Просеков, Юлия В. Голубцова консультация в ходе исследования

Оксана В. Козлова предложила методику проведения эксперимента

Евгения А. Козленко обзор литературных источников по исследуемой проблеме

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors

Anna D. Vesnina graduate student, institute of food science and technology, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, koledockop1@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4552-7418>

Alexander Yu. Prosekov Dr. Sci. (Engin.), professor, bionanotechnology department, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, aprosekov@rambler.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Oksana V. Kozlova Dr. Sci. (Engin.), associate professor, technological institute of food industry, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, ms.okvk@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2960-0216>

Marina G. Kurbanova Dr. Sci. (Engin.), technology of food of animal origin department, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, kurbanova-mg@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0563-1007>

Evgeniya A. Kozlenko graduate student, institute of food science and technology, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, evgenia_09.01@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6708-5964>

Yulia V. Golubtsova Dr. Sci. (Engin.), professor, technology and organization of public catering department, Kemerovo State University, st. Krasnaya, 6, Kemerovo, 650000, Russia, op.kemsu@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2958-4172>

Contribution

Anna D. Vesnina, Marina G. Kurbanova wrote the manuscript, responsible for plagiarism

Alexander Yu. Prosekov, Yulia V. Golubtsova consultation during the study

Oksana V. Kozlova proposed a scheme of the experiment and organized production trials

Evgeniya A. Kozlenko review of the literature on an investigated problem, conducted an experiment, performed computations

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 21/01/2021

После редакции 17/02/2021

Принята в печать 02/03/2021

Received 21/01/2021

Accepted in revised 17/02/2021

Accepted 02/03/2021