УДК 612.33

ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ КИШЕЧНОГО ТРАКТА

М.В. Шишин, А.Ю. Просеков*

ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

**e-mail: rectorl@kemtipp.ru*

Дата поступления в редакцию: 27.10.2015
Дата принятия в печать: 05.11.2015

Кишечная микробиота играет важную роль в нормальном функционировании кишечника и поддержании здоровья организма. В работе выделили и идентифицировали микроорганизмы кишечного тракта здоровых людей и людей с онкологическими заболеваниями. Изучали культуральные и морфологические свойства микроорганизмов на плотной питательной среде. В процессе изучения определили диаметр колоний в миллиметрах, цвет, форму, консистенцию, структуру, поверхность, характер контура края. Анализировали характер роста бактерий на жидких питательных средах (придонный, пристеночный или поверхностный, рост с равномерным помутнением среды). Основной метод изучения морфологии бактерий, который использовали для изучения бактерий, – микроскопия фиксированных окрашенных препаратов. Показано, что в кишечном тракте здоровых людей и больных онкологическими заболеваниями присутствуют бактерии следующих родов: *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Salmonella, Shigella, Citrobacter, Serratia, Pseudomonas, Staphylococcus, Micrococcus, Peptococcus, Sarcina, Enterococcus, Streptococcus, Peptostreptococcus, Actinomyces, Neisseria, Acinetobacter, Mogaxella, Bacillus, Bacteroides, Fusobacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium, Campylobacter, Helicobacter, Leptotrichia, Prevotella. Также из кишечного тракта человека выделены грибы родов Candida и Cryptococcus*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальной антимикробной активностью характеризуются следующие виды микроорганизмов: *Bifidobacterium bifidum* (диаметр зон ингибирования роста тест-культур составляет от 28,9 до 37,0 мм), *Bifidobacterium breve* (диаметр зон ингибирования – от 26,8 до 35,6 мм), *Lactobacillus spp.* (диаметр зон ингибирования – от 24,9 до 38,2 мм), *Micrococcus spp.* (диаметр зон ингибирования – от 25,2 мм до 36,7 мм), *Streptococcus agalactiae* (диаметр зон ингибирования – от 27,6 до 38,4 мм).

Кишечный тракт, бактерии, морфологические признаки, антимикробная активность

Введение

Кишечный тракт представляет собой одну из наиболее сложных экологических сред организма человека, в которой на суммарной площади слизистой оболочки, составляющей около 400 м^2, имеется исключительно высокая и разнообразная (свыше 500 видов) плотность микробной обсеменённости, в которой очень тонко сбалансировано взаимодействие между защитными системами организма и микробными ассоциациями. Бактерии составляют от 35 до 50 % объема содержимого ободочной кишки человека, а их совокупная биомасса в желудочно-кишечном тракте приближается к 1,5 кг [1, 2].

Толстый кишечник – наиболее густо заселённая область кишечного тракта, включающая в себя микрофлору в концентрации 10^{11} КОЕ/г кишечного содержимого [3]. Данная область обеспечивает лучший бактериальный рост с низким временем транзита, наличие готовых питательных веществ и благоприятный pH. Кишечная микробиота играет важную роль в нормальном функционировании кишечника и поддержании здоровья организма. Достаточно изучено, как члены индигенной микробиоты функционируют с организмом для достижения положительных симбиотических связей. Бактерии рода *Lactobacillus* обнаруживаются на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, но состав микробиоты меняется в зависимости от возраста и периодов жизни. Лактобациллы принадлежат к молочнокислым бактериям, так как конечным продуктом их углеводного обмена является молочная кислота. Род *Lactobacillus* включает в себя большую гетерогенную группу грамположительных неспорообразующих анаэробных бактерий [4]. Таксономически род *Lactobacillus* принадлежит к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, семейству *Lactobacillaceae*. Близкородственные микроорганизмы рода *Paralactobacillus* и *Pediococcus* также относятся к семейству *Lactobacillaceae*. Род *Lactobacillus* является наиболее многочисленным родом порядка *Lactobacillales* и включает в себя 106 описанных видов [5]. Очень тяжело отличить аутохтонные лактобациллы от аллохтонных, транзиторных лактобацилл, выделенных, например, из продуктов питания или ротовой полости, являющейся местом обитания большинства лактобацилл. Лактобациллы составляют небольшую долю от всей кишечной микробиоты – от 0,01 до 0,6% [6].

L. gasseri, L. reuteri, L. crispatus, L. salivarius, L. ruminis являются предоминантными аутохтонными штаммами лактобацилл. *L. acidophilus, L. fermentum, L. casei, L .rhamnosus, L. johnsonii, L. plantarum, L. brevis, L. delbrueckii, L. curvatus, L. sakei* также присутствуют в желудочно-кишечном тракте, но их состав постоянно меняется. Несмотря на то что лактобациллы выделяют из биоптатов желудка, тонкого и толстого кишечника, их

количество достаточно вариабельно и ниже реальных цифр [7].

Объекты и методы исследований

Выделение штаммов. Готовили базальную среду для культивирования следующего состава (г/л): пептон (2 г), дрожжевой экстракт (2 г), Tween 80 (2 мл), гемин (50 мг), витамин K_1 (9,67 мкл), L-цистеин HCl (0,5 г), соли желчных кислот (0,5 г), NaCl (0,1 г), $NaHCO_3$ (2 г), K_2HPO_4 (40 мг), KH_2PO_4 (40 мг), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 мг) и $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (10 мг). Буферы и среды переносили сразу же после автоклавирования в анаэробный шкаф (N_2 80 %, 10 % CO_2, H_2 10 %). Хлорогеновую кислоту растворяли в стерильной горячей воде и стерилизовали с использованием фильтров (размер пор 0,2 мкм). Образцы фекалий (100 г/л) немедленно гомогенизировали в анаэробно-приготовленном натрий-фосфатном буфере, 50 мМ pH 7,0. Инкубацию проводили при 37 °С в анаэробных условиях. Образцы отбирали в различное время инкубации и либо обрабатывали немедленно (разбавления), либо хранили при 18 °С (для анализа ВЭЖХ и определения эстеразной активности) [8, 9].

Делали серию десятикратных разведений растворов фекалий в физиологическом растворе (содержащем пептон 5 г/л, NaCl 2,5 г/л и L-цистеин HCl 0,5 г/л, pH доводили 1 моль/л NaOH до 7,0) в анаэробных условиях. Растворы высевали на общую и селективную среду СМИ (Oxoid). Для *Bacteroides spp., Brucella* питательный агар (45 г/л) дополняли следующими компонентами: витамин К1 (9,67 г/л) и гемин (5 мг /л), лошадиная кровь (50 мл/л, добавляют после автоклавирования), канамицин (75 мг/л) и ванкомицин (75 мг/л, добавлен после автоклавирования) [9].

Для *Clostridium spp*. использовали агар Wilkens-Chalgren (43 г/л) с новобиоцином и колистином, добавленными после автоклавирования (8 мг/л). Beeren-х агар (для *Bifidobacterium spp.*) готовили из Колумбийского агара (44 г/л), глюкозы (5 г/л), L-цистеина HCl (0,5 г/л), агара (5 г/л) и пропионовой кислоты (5 мл/л, добавляют после автоклавирования), с последующим доведением pH до значения 5,0 раствором NaOH 1 моль/л. Чашки инкубировали при 37 °С в течение ночи в аэробных условиях (на питательном агаре и на агаре МакКонки) или 4 дня в анаэробной камере (другие агары). Колонии с различной морфологией пересевали, используя ту же среду и условия инкубации [9].

Скрининг штаммов (*Echerihia coli, Bifidobacterium, Lactobacillus*). Этиловый ферулат (EtFA; 1 % объем к объему исходного раствора в метаноле) асептически добавляли к агару после автоклавирования до концентрации 1 г/л. Использовали два типа культуральной среды: базальный агар (базальная среда с 15 г/л агара) и сердечно-мозговой агар (BHI бульон с 15 г/л агара). Для штаммов, выделенных в анаэробных условиях, BHI агар был использован с добавлением гемина, витамина K_1 и L-цистеина HCl в тех же концентрациях, как в базальной среде (BHI +). Инокулят каждой чистой культуры переносили на оба типа EtFA-дополненных агаров (базальный, BHI / BHI +). Затем чашки инкубировали в течение 3 дней при 37 °С в тех же самых условиях (аэробных или анаэробных), используемых для культивирования исходной культуры. Наличие четкой зоны вокруг посева указывает на распад EtFA у изолята. Чтобы подтвердить выделение феруловой кислоты (FA), очищенные образцы агара три раза экстрагировали этилацетатом после 1 ч выдержки в разбавленном растворе HCl (pH 1,5). Объединенные органические фазы упаривали при пониженном давлении и снова растворяли в смеси метанол / вода (1:1) перед ВЭЖХ анализом. В качестве контролей использовали образцы чистого агара, обработанные в аналогичных условиях культивирования [9].

Выделение, идентификация и рост бактериальных штаммов. Каждый образец, выделенный из фекалий, выращивали в течение 24 ч при 37 °С в обогащенной среде Selenit Broth (Oxoid CM395) для образцов кала. Выделение микроорганизмов проводили на агаре SS (Oxoid CM99) и CPSID (BioMerieux 43211) с последующей изоляцией. При необходимости образцы восстанавливали в сердечно-мозговом бульоне. Идентификацию штаммов проводили с использованием стандартных биохимических методов классификации (Мюррей и др., 1999) с использованием API20E, API 20 Ne, API Staphy и API Шаг (BioMerieux) в соответствии с рекомендациями, вынесенными Йоргенсен и другими (1999), за которым следует генетическая идентификация через 16S рРНК последовательности. После идентификации штаммы хранили в аликвотах сердечно-мозгового бульона (среда BHI, Oxoid). С помощью этой процедуры могут быть идентифицированы следующие бактериальные штаммы: *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Acinetobacter baumanii, Citrobacter freundii, Enterobacter asburiae, Ent. cloacae, Enterobacter hormaechei, E. coli* (2 штамма), *Hafnia alvei, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Stenotrophomonas maltophilla*.

Изучение культуральных и морфологических свойств микроорганизмов проводили на плотной питательной среде – МПА. В ходе изучения определяли диаметр колоний, цвет, форму, консистенцию, структуру, поверхность, характер контура края. Изучали также характер роста бактерий на жидких питательных средах (придонный, пристеночный или поверхностный, рост с равномерным помутнением среды). Для выявления отношения микроорганизмов к кислороду культуру засевали уколом бактериологической иглы в пробирки с высоким столбиком агара.

Основной метод изучения морфологии бактерий – микроскопия фиксированных окрашенных препаратов. Микроскопирование проводили с использованием микроскопа биологического Axio Scope A1 («Carl Zeiss», Германия). Определение размеров клеток изучаемых культур микроорганизмов проводили с использованием окулярной линейки и объект-микрометра [9].

Дифференцировку бактерий по биохимическим свойствам их клеточной стенки проводили по Граму с использованием набора для окраски по Граму («Лаб-Биомед», Москва). Суть метода заключается в том, что клеточная стенка грамположительных бактерий прочно фиксирует генциан-виолет, не обесцвечивается этанолом и потому не воспринимает дополнительный краситель (фуксин). У грамотрицательных микробов генциан-виолет легко вымывается из клетки этанолом и они окрашиваются дополнительным красителем [9].

Определение антимикробной активности микроорганизмов, выделенных из кишечного тракта человека, осуществляли следующим образом. Все штаммы выращивали в жидких питательных средах в пробирках по 5 мл стационарно в течение 3 суток, затем центрифугировали, а супернатант фильтровали через мембранные фильтры 22 μm. Полученный стерильный раствор метаболитов использовали для экспериментов.

Для работы брали взвесь ночных бульонных культур тест-штаммов (*E. coli B-6954, Staphylococcus aureus* ATCC 25923*, Salmonella enterica* ATCC 14028*, Listeria innocua LMG, Clostridium tyrobutyricum LMG, Klebsiella pneumoniae* B-7001), выращенных на стандартных питательных средах. Количество микроорганизмов (титр) во взвеси определяли по оптической плотности (ОП) при длине волны 595 нм.

Исследование антимикробных свойств микроорганизмов проводили диффузионным методом. Для этого тест-штамм высевали на агаризованную питательную среду (РПА) газоном и одновременно на газон накладывали бумажные диски, пропитанные метаболитами микроорганизмов, выделенных из кишечного тракта человека (10 мкл/диск). В качестве контроля использовали диск со средой MRS, в качестве препарата сравнения – диск с антибиотиком ципрофлоксацином (из стандартного набора). Чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Результаты учитывали по наличию и размеру (в мм) прозрачной зоны отсутствия роста микроорганизмов вокруг диска [9].

Результаты и их обсуждение

Выделяли микроорганизмы от здоровых людей разных возрастных групп и больных онкологическими заболеваниями кишечного тракта (образцы получены от пациентов из Российской Федерации). Для выделенных микроорганизмов изучали морфологические и пробиотические свойства.

В табл. 1 приведены результаты анализа морфологических свойств микроорганизмов, выделенных из кишечного тракта здоровых людей и больных онкологическими заболеваниями.

Таблица 1

Морфологические свойства микроорганизмов, выделенных из кишечного тракта

Микроорганизмы	Морфологические свойства
Бактерии рода *Escherichia*	Прямые грамотрицательные палочки со слегка закруглёнными концами (1,1–1,5x2,0–6,0 мкм), расположенные одиночно
Бактерии рода *Klebsiella*	Прямые грамотрицательные палочки (0,3–1,0x0,6–6,0 мкм), располагающиеся одиночно, парами, короткими цепочками
Бактерии рода *Enterobacter*	Прямые грамотрицательные палочки (0,3–0,6x0,8–2,0 мкм), располагающиеся одиночно и парами
Бактерии рода *Proteus*	Прямые грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,4–0,8x1–3 мкм), расположенные одиночно
Бактерии рода *Salmonella*	Прямые с закругленными концами грамотрицательные палочки (0,7–1,5x2–5 мкм), расположенные одиночно
Бактерии рода *Shigella*	Прямые грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,7–1,0x1–3 мкм), расположенные одиночно
Бактерии рода *Citrobacter*	Прямые грамотрицательные палочки (1,0x2,0–6,0 мкм), располагающиеся одиночно и парами
Бактерии рода *Serratia*	Прямые грамотрицательные палочки (0,5–0,8x0,9–2,0 мкм), располагающиеся одиночно
Бактерии рода *Pseudomonas*	Прямые или изогнутые грамотрицательные палочки (0,5–1,0x1,5–5,0 мкм), располагающиеся одиночно
Бактерии рода *Staphylococcus*	Грамположительные круглые кокки диаметром 1 мкм, располагающиеся в виде скоплений, напоминающих виноградные гроздья
Бактерии рода *Peptococcus*	Круглые грамположительные кокки размером 0,3–1,2 мкм, располагающиеся парами, тетрадами, в виде неправильных скоплений или короткими цепочками
Бактерии рода *Sarcina*	Шаровидные грамположительные бактерии (0,5–1 мкм), располагающиеся в виде пакетов из 8 и более кокков
Бактерии рода *Enterococcus*	Овоидной формы грамположительные бактерии, располагающиеся парами или короткими цепочками (0,6–2,0x0,6–2,5 мкм)
Бактерии рода *Streptococcus*	Грамположительные кокки неправильной круглой формы, располагающиеся в виде цепочек или попарно (0,5–2,0 мкм)
Бактерии рода *Peptostreptococcus*	Круглые грамположительные сферические кокки размером 0,5–1,2 мкм, располагающиеся парами, небольшими неправильными скоплениями или цепочками
Дрожжеподобные грибы рода *Candida*	Скопления мелких округлых грамположительных дрожжеподобных клеток (1,5 до 10 мкм) вокруг псевдомицелия, характерно образование «ростковых трубок»

Окончание табл. 1

Грибы рода *Cryptococcus*	Грамположительные округлые или овальные дрожжевые клетки (4–8 мкм)
Бактерии рода *Actinomyces*	Тонкие прямые, слегка изогнутые грамположительные палочки (0,2–1,0х2,0-5,0 мкм), с утолщениями на концах, располагающиеся одиночно, парами, а также в виде скоплений
Бактерии рода *Neisseria*	Мелкие до 1 мкм грамотрицательные диплококки, располагающиеся в виде пары кофейных зёрен, обращенных вогнутыми поверхностями друг к другу
Бактерии рода *Acinetobacter*	Грамотрицательные палочки (0,9–1,6х1,5–2,5 мкм), располагающиеся парами или цепочками различной длины
Бактерии рода *Mogaxella*	Грамотрицательные толстые короткие кокковидные бактерии (1,0–1,5х1,5–2,5 мкм)
Бактерии рода *Bacillus*	Грамположительные палочки (0,5–2,5х1,2–10 мкм), располагающиеся одиночно, или небольшими скоплениями
Бактерии рода *Bacteroides*	Палочковидные грамотрицательные плеоморфные бактерии, значительно варьирующие по размерам
Бактерии рода *Fusobacterium*	Полиморфные грамотрицательные палочки с закруглёнными или заостренными концами различной длины
Бактерии рода *Bifidobacterium*	Грамположительные полиморфные палочки (0,5–1,3х1,5–8 мкм), слегка изогнутые или ветвящиеся (в виде латинских букв Y, X)
Бактерии рода *Eubacterium*	Полиморфные грамположительные бактерии, значительно варьирующие в размерах (0,2–2,0х0,3–10,0 мкм) и форме: от кокковидых до длинных палочковидных
Бактерии рода *Clostridium*	Грамположительные палочковидные плеоморфные спорообразующие бактерии (0,3–2,0х1,5–20,0 мкм), располагающиеся парами или короткими цепочками
Бактерии рода *Campylobacter*	Грамотрицательные извитые бактерии (0,2–0,5х0,5–5 мкм), имеющие S-образную форму с одним витком и более
Бактерии рода *Helicobacter*	Грамотрицательные неспорообразующие, микроаэрофильные палочки изогнутой, S-образной формы
Бактерии рода *Leptotrichia*	Прямые или слегка изогнутые грамотрицательные палочки (0,8–1,5х5–15 мкм)
Бактерии рода *Prevotella*	Полиморфные грамотрицательные палочки, располагающиеся скоплениями

Из табл. 1 следует, что в кишечном тракте здоровых людей и больных онкологическими заболеваниями присутствуют бактерии следующих родов: *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Salmonella, Shigella, Citrobacter, Serratia, Pseudomonas, Staphylococcus, Micrococcus, Peptococcus, Sarcina, Enterococcus, Streptococcus, Peptostreptococcus, Actinomyces, Neisseria, Acinetobacter, Mogaxella, Bacillus, Bacteroides, Fusobacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium, Campylobacter, Helicobacter, Leptotrichia, Prevotella.* Также из кишечного тракта человека выделены грибы родов *Candida и Cryptococcus*.

Одним из основных свойств представителей нормальной микрофлоры кишечного тракта является антимикробная антагонистическая активность. Данное свойство проявляется за счет способности продуцировать в качестве главного продукта сбраживания углеводов молочную кислоту и антибиотические вещества (бактериоцины), подавляющие рост гнилостных, патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Для проведения дальнейших исследований важно знать, какие микроорганизмы обладают наибольшей антимикробной активностью. Определили антагонистическую активность методом перпендикулярных штрихов представителей нормальной микрофлоры, выделенной из кишечного тракта здоровых людей и больных онкологическими заболеваниями, по отношению к патогенным микроорганизмам: *Escherichia coli* B-6954*, Bacillus fastidiosus* B-5651*, Pseudomonas fluorescens* B-3502*, Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*, Leuconostoc mesenteroides* B-8404*, Candida albicans* ATCC 885-653*, Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Полученные результаты представлены в табл. 2. Чистые микроорганизмы брали из образцов фекалий (100 г/л).

Таблица 2

Результаты определения антимикробной активности представителей нормальной микрофлоры, выделенной из кишечного тракта здоровых людей и больных онкологическими заболеваниями

Штамм	Диаметр зон ингибирования роста тест-культур, мм						
	Escherichia coli B-6954 -	*Bacillus fastidiosus B-5651 +*	*Pseudomonas fluorescens B-3502 -*	*Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 -*	*Leuconostoc mesenteroides B-8404 +*	*Candida albicans ATCC 885-653*	*Staphylococcus aureus ATCC 25923 +*
Actinomyces meyeri	5,6±0,3	8,7±0,4	11,6±0,8	12,3±0,6	7,2±0,4	8,5±0,4	9,0±0,5
Actinomyces odontolyticus	15,5±0,8	12,4±0,6	8,8±0,4	10,2±0,5	6,3±0,4	13,4±0,7	12,0±0,6
Bacteroides ovatus	5,3±0,3	8,5±0,4	6,2±0,3	10,1±0,5	11,8±0,6	6,3±0,3	7,8±0,4

Окончание табл. 2

Bifidobacterium bifidum	36,5±1,8	28,9±1,4	32,0±1,6	29,3±1,6	30,9±1,5	33,1±1,7	37,0±1,9
Bifidobacterium breve	28,4±1,4	30,6±1,5	33,2±1,7	35,6±1,8	26,8±1,3	29,0±1,5	31,1±1,6
Bifidobacterium dentium	5,5±0,3	8,9±0,4	14,5±0,7	12,0±0,6	11,4±0,6	10,5±0,5	9,3±0,5
Clostridium butyricum	7,7±0,4	11,5±0,6	8,0±0,4	14,7±0,7	15,0±0,8	12,2±0,6	6,8±0,3

Данные исследований свидетельствуют о том, что максимальной антимикробной активностью по отношению к рассматриваемым тест-штаммам характеризуются следующие виды микроорганизмов: *Bifidobacterium bifidum* (диаметр зон ингибирования роста тест-культур составляет от 28,9 до 37,0 мм), *Bifidobacterium breve* (диаметр зон ингибирования – от 26,8 до 35,6 мм), *Lactobacillus spp*. (диаметр зон ингибирования – от 24,9 до 38,2 мм), *Micrococcus spp*. (диаметр зон ингибирования – от 25,2 до 36,7 мм), *Streptococcus agalactiae* (диаметр зон ингибирования – от 27,6 до 38,4 мм).

Результаты исследований являются практически значимыми, так как важным свойством пробиотических штаммов, выделенных из кишечного тракта человека, в связи с их использованием в технологии создания функциональных продуктов питания для реабилитации онкологических больных является антагонистическая активность. Наибольшей антогонистической активностью характеризуются бесклеточные экстракты штаммов *Lactobacillus fermentum* (тролокс-эквивалент на 10^9 клеток равен 2182), *Micrococcus spp*. (тролокс-эквивалент на 10^9 клеток равен 1968) и *Lactobacillus plantarum* (тролокс-эквивалент на 10^9 клеток равен 1914).

Список литературы

1. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения (обзорная статья) / М.С. Жаркова, Д.С. Орлов, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология. – 2014. – № 1. – С. 98–114.

2. Картузова, О.В. Определение доли активности ферментов в различных молокосвертывающих препаратах / О.В. Картузова, А.Ю. Просеков, О.О. Шишко, Л.К. Асякина, О.О. Бабич, М.И. Зимина, С.Ю. Гармашов, О.Е. Бушуева // Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире. – 2015. – № 10–4. – С. 107–110.

3. Беседнова, Н.Н. Иммунокорректоры // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № S3. – С. 111–117.

4. Грач, А.А. Роль альтернативных механизмов удлинения теломер в канцерогенезе и перспективы использования антителомеразных средств в лечении злокачественных опухолей / А.А. Грач // Цитология. – 2011. – Т. 53. – № 10. – С. 759–771.

5. Делягин, В.М. Химио- и радиотоксические поражения сердца у детей и подростков с онкогематологическими заболеваниями / В.М. Делягин, Ю.В. Демидова, Е.А. Тихомирова // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2014. – № 2. – С. 49–52.

6. Исследование процесса комплексообразования рекомбинантных hsp70 человека с опухолеассоциированными пептидами / В.А. Черников, Н.В. Гороховец, Л.В. Савватеева, С.Е. Северин // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – № 6. – С. 651–661.

7. РНКаза с противоопухолевым действием (биназа) вызывает изменение клеточной проницаемости / Э.А. Кабрера-Фуентес, П.В. Зеленихин, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII. – № 3. – С. 72–76.

8. Клебанов, Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови / Г.И. Клебанов, Ю.О. Теселкин, И.В. Бабенкова // Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 15–22.

9. Короленко, Т.А. Цистатины – биологическая роль и нарушения в патологии / Т.А. Короленко // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2008. – № 4. – С. 43– 45.

10. Практикум по микробиологии / под ред. проф. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – С. 308.

INVESTIGATION OF MORPHOLOGICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF INTESTINAL TRACT MICROORGANISMS

M.V. Shishin, A.Yu. Prosekov*

Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia

**e-mail: rector@kemtipp.ru*

Received: 27.10.2015
Accepted: 05.11.2015

The intestinal microbiota plays an important role in the normal functioning of the intestine and maintaining the health of the organism. Microorganisms from intestinal tracts of healthy people and cancer patients were isolated and identified. The culture and the morphological properties of microorganisms were studied on solid medium. During the study the diameter of the colonies in millimeters, color, shape, texture, structure, surface, edge contour character were determined. The nature of the bacterial growth in the liquid media (bottom, parietal or surface, with uniform medium turbidity) was analyzed. The main method of studying the morphology of the bacteria was microscopy of fixed stained preparations. It is shown that the intestinal tract of healthy people and cancer patients contains bacteria of the following genera: *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Salmonella, Shigella, Citrobacter, Serratia, Pseudomonas, Staphylococcus, Micrococcus, Peptococcus, Sarcina, Enterococcus, Streptococcus, Peptostreptococcus, Actinomyces, Neisseria, Acinetobacter, Moraxella, Bacillus, Bacteroides, Fusobacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium, Campylobacter, Helicobacter, Leptotrichia, Prevotella.* Also the following fungi were isolated from human intestinal tract: *Candida* and *Cryptococcus*. The results indicate that the following microorganisms show the maximum antimicrobial activity: *Bifidobacterium bifidum* (the diameter of test culture growth inhibition zones is from 28.9 mm to 37.0 mm), *Bifidobacterium breve* (the diameter of inhibition zones - from 26.8mm to 35.6 mm), *Lactobacillus spp*. (the diameter of inhibition zones – from 24.9 mm to 38.2 mm), *Micrococcus spp*. (the diameter of inhibition zones – from 25.2 mm to 36.7 mm), *Streptococcus agalactiae* (the diameter of inhibition zones - from 27.6 mm up to 38.4 mm).

Intestinal tract, bacteria, morphological characteristics, antimicrobial activity

References

1. Zharkova M.S., Orlov D.S., Kokryakov V.N., Shamova O.V. Antimikrobnye peptidy mlekopitayushchikh: klassifikatsiya, biologicheskaya rol', perspektivy prakticheskogo primeneniya (obzornaya stat'ya) [Mammalian antimicrobial peptides: classifi cation, biological role, perspectives of practicale use]. *Vestnik Sankt–Peterburgskogo universiteta. Seriya 3: Biologiya* [Vestnik of Saint-Petersburg University. Series 3. Biology], 2014, no. 1, pp. 98–114.

2. Kartuzova O.V., Prosekov A.Yu., Shishko O.O., Asyakina L.K., Babich O.O., Zimina M.I., Garmashov S.Yu., Bushueva O.E. Opredelenie doli aktivnosti fermentov v razlichnykh molokosvertyvayushchikh preparatakh [Definition of a share of activity of enzymes in various the molokosvertyvayushchikh preparations]. *Fundamental'nye i prikladnye issledovaniya v sovremennom mire* [Fundamental and applied research in the modern world], 2015, no. 10-4, pp. 107–110.

3. Besednova N.N., Leonova G.H., Zaporozhets T.S. Immunokorrektory v kompleksnom lechenii virusnykh infektsiy [Immunocorrectors in complex treatment of virus infections]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology], 2006, no. S3, pp. 111–117.

4. Grach A.A. Rol' al'ternativnykh mekhanizmov udlineniya telomer v kantseroge- neze i perspektivy ispol'zovaniya antitelomeraznykh sredstv v lechenii zlokachestvennykh opukholey [The role of alternative lengthening of telomeres mechanisms in carcinogenesis and prospects for using an anti-telomerase drugs in malignant tumors treatment]. *Tsitologiya*, 2011, vol. 53, no. 10, pp. 759–771.

5. Delyagin V.M., Demidova Yu.V., Tikhomirova E.A. Khimio- i radiotoksicheskie porazheniya serdtsa u detey i podrostkov s onkogematologicheskimi zabolevaniyami [Chemo- and radio toxic cardiac lesions in children and adolescents with oncohematological diseases] *Pediatriya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum* [Pediatrics. Application of the journal Consilium Medicum], 2014, no. 2, pp. 49–52.

6. Chernikov V.A., Gorokhovets N.V., Savvateeva L.V., Severin S.E Issledovanie protsessa kompleksoobrazovaniya rekombinantnykh hsp70 cheloveka s opukholeassotsiirovannymi peptidami [Analysis of complex formation of human recombinant hsp70 with tumor-associated peptides]. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2012, vol. 58, no. 6, pp. 651–661.

7. Cabrera-Fuentes E.A., Zelenikhin P.V., Kolpakov A.I., Il'inskaya O.N. RNKaza s protivoopukholevym deystviem (binaza) vyzy- vaet izmenenie kletochnoy pronitsaemosti [Antitumor RNase (binase) induces the alteration of cellular permeability]. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Genes & Cells], 2012, vol. VII, no. 3, pp. 72–76.

8. Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I.V. Antioksidantnaya aktivnost' syvorotki krovi [The antioxidant activity of blood serum]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences]. 1999, no. 2, pp. 15–22.

9. Korolenko T.A. Tsistatiny – biologicheskaya rol' i narusheniya v patologii [Cystatin - biological role in the pathology of disorders]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk* [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences], 2008, no. 4, no. 43–45.

10. Egorova N.S. *Praktikum po mikrobiologii* [Practical work on microbiology]. Moscow, MGU Publ., 1976. 308 p.

Дополнительная информация / Additional Information

Шишин, М.В. Исследование морфологических и антимикробных свойств микроорганизмов кишечного тракта / М.В. Шишин, А.Ю. Просеков // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – Т. 39. – № 4. – С. 131–137.

Shishin M.V., Prosekov A.Y. Investigation of morphological and antimicrobial properties of intestinal tract microorganisms. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 134–137 (In Russ.)

Шишин Михаил Викторович
аспирант кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет), 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-05-37

Просеков Александр Юрьевич
д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой бионанотехнологии, ректор, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет), 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-05-37, e-mail: rector@kemtipp.ru

Mikhail V. Shishin
Postgraduate Student of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-05-37

Aleksandr Yu. Prosekov
Dr.Sci.(Eng.), Professor, Head of Department of Bionanotechnology, Rector, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-05-37, e-mail: rector@kemtipp.ru