

УДК 579.864

АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ ВІД ПОРОДИЛЬ ТА НЕМОВЛЯТ, У ПОЄДНАННІ З ЇХ АНТИБІОТИКОРЕЗИТЕНТНІСТЮ

Швець Г. В., Донцова Т. А., Іваниця В. О.

Одеський державний університет, кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 270026, Україна

Виділені і відібрані штами лактобацил, перспективні для створення пробіотичних мікробних препаратів для корекції мікробіоценозу піхви жінок та дизбактеріозу новонароджених. Одержані два штами *L. acidophilus*. та один штам *L. casei subsp. rhamnosus*, що поєднують високу антагоністичну активність з широким спектром антибіотикорезистентності. Штами, ізольовані з піхви жінок, проявляли більшу антагоністичну активність, ніж ізольовані з прямої кишки, незважаючи на те, що під час пологів кількісний та якісний склад мікрофлори родових шляхів зазнає значних змін. Штами, виділені від дітей, перевищували за своєю активністю як вагінальні, так і ректальні жіночі. 52,9 % усіх виділених штамів лактобацил відносились до облігатно гомоферментативних, 35,2 % — до факультативно гетероферментативних і 11,9 % — до облігатно гетероферментативних молочнокислих бактерій.

Ключові слова: лактобацили, антагоністична активність, антибіотикорезистентність.

Останні десятиріччя характеризуються тенденцією зростання частоти виникнення дизбіотичних порушень організму людини, зумовлених цілою низкою причин. Особливу небезпеку являють мікроекологічні порушення нормобіоценозу родових шляхів у жінок репродуктивного віку, які в більшості випадків спричиняють безпліддя, ненормальне протікання вагітності та пологів, а також септичних захворювань у новонароджених [5, 12].

Одним із сучасних напрямків у розв'язанні проблем корекції мікробіоценозу уrogenітального тракту вагітних та шлунково-кишкового тракту новонароджених є застосування біологічно активних мікроорганізмів, а саме молочнокислих бактерій [2, 11].

Вибір лактобацил як ключових чинників виробництва препаратів та продуктів лікувального харчування ґрунтується на тому, що ці мікроорганізми забезпечують колонізаційну резистентність організму завдяки конкурентній цитадгезії та антагоністичним властивостям. Пошук штамів-пробіотиків ведеться серед штамів, що характерні для даної екологічної ніші [4, 7].

У зв'язку з цим мета даної роботи — дослідження біологічних властивостей лактобацил організму матері та дитини, вивчення їх взаємодії з іншими представниками мікробного ценозу та спрямований пошук найбільш активних штамів лактобацил.

Матеріали та методи

У ході дослідження було виділено 14 штамів лактобацил. З них 5 ізольовані від новонароджених (віком до 5 днів), що знаходились на природному вигодовуванні, 4 — з товстого кишечника породіль, 5 — з піхвового секрету породіль. Лактобацили виділяли за допомогою п'ятикратних пересівів одержаних проб в знежирене стерильне молоко. Ідентифікацію проводили за спеціальною методикою [13] на рідкому середовищі MRS з додаванням різних вуглеводів.

Після мікроскопічного вивчення чистоти та типової морфології культур у всіх виділених штамів лактобацил перевіряли чутливість до антибіотиків пеніцилінової, цефалоспоринової, тетрациклінової, аміноглікозидної груп методом дифузії в MRS-агар з використанням дисків антибіотиків [3].

Посіви інкубували в мікроаерофільних умовах при 40 °С протягом 24 годин. Визначення чутливості культур до антибіотиків і оцінку результатів проводили відповідно діючій інструкції [8].

Для визначення антагоністичної активності виділених штамів використовували метод культивування на щільному середовищі з використанням агарових блоків [3]. Як тест-мікроорганізми використовували *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*. Штамом для порівняння був відомий виробничий штам *Lactobacillus acidophilus* 317/402, який є основою для одержання лікувально-профілактичного препарату "Наріне" та продуктів харчування.

Результати дослідження

Результати досліджень показали (табл. 1), що штамів, стійких до антибіотиків, значно більше, ніж чутливих, причому більшість з них характеризується широким спектром антибіотикостійкості.

Таблиця 1

Відношення виділених штамів лактобацил до антибіотиків

Виділені штами	Джерело виділення	Кількість антибіотиків, до яких даний штам стійкий		Кількість антибіотиків, до яких даний штам чутливий	
		абсолютна	відносна, %	абсолютна	відносна, %
<i>L. acidophilus</i>	фекалії новородженого	18	85,7	3	14,3
<i>L. bifementans</i>	фекалії новородженого	17	80,9	4	19,1
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i>	фекалії новородженого	18	85,7	3	14,3
<i>L. acidophilus</i>	фекалії новородженого	14	66,7	7	33,3
<i>L. plantarum</i>	фекалії новородженого	15	71,4	6	28,6
<i>L. acidophilus</i>	товстий кишечник породіллі	13	61,9	8	38,1
<i>L. acidophilus</i>	товстий кишечник породіллі	17	80,9	3	19,1
<i>L. plantarum</i>	товстий кишечник породіллі	14	66,7	7	33,3

Виділені штами	Джерело виділення	Кількість антибіотиків, до яких даний штам стійкий		Кількість антибіотиків, до яких даний штам чутливий	
		абсолютна	відносна, %	абсолютна	відносна, %
<i>L. fermentum</i>	товстий кишечник породіллі	14	66,7	7	33,3
<i>L. acidophilus</i>	півховий секрет породіллі	21	100	—	—
<i>L. acidophilus</i>	півховий секрет породіллі	18	85,7	3	14,3
<i>L. acidophilus</i>	півховий секрет породіллі	14	66,7	7	33,3
<i>L. plantarum</i>	півховий секрет породіллі	16	76,2	5	23,8
<i>L. agilis</i>	півховий секрет породіллі	12	57,1	9	42,9

Більшості з досліджених штамів властива досить висока антагоністична активність (табл. 2). Антагоністична активність цих штамів по відношенню до *E. coli* і *Ps. fluorescens* не менше як в 1,5 рази перевищувала активність штаму *L. acidophilus* 317/402. На тест-організми *S. aureus* та *S. enteritidis* штам, ізольований з препарату "Наріне", антагоністичної дії не виявив, в той час як виділені нами штами діяли досить активно.

Таблиця 2

Антагоністична активність виділених штамів лактобацил

Виділені штами	Джерело виділення	Тест-мікроорганізми Діаметр зони затримки росту, мм				
		<i>S. aureus</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
<i>L. acidophilus</i>	фекалії новонародженого	23,3±2,1	42,3±1,8	25,1±1,1	32,3 ±2,3	23,4±1,3
<i>L. bif fermentans</i>	фекалії новонародженого	20,3±1,6	25,2 ±1,7	16,3±1,2	22,4±1,6	18,5±1,3
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i>	фекалії новонародженого	30,9±1,2	32,2±1,7	25,4±1,6	28,2±1,3	44,8±1,1
<i>L. acidophilus</i>	фекалії новонародженого	20,3±1,2	22,1±1,8	30,3±2,1	23,4±1,7	22,3±1,2
<i>L. plantarum</i>	фекалії новонародженого	17,3±1,1	29,2 ±1,3	21,4±1,8	22,5±1,2	18,3±1,4
<i>L. acidophilus</i>	товстий кишечник породіллі	23,5±1,6	31,2±1,8	24,3±1,1	26,3±1,9	22,5±1,1
<i>L. acidophilus</i>	товстий кишечник породіллі	20,9±1,2	22,3±1,7	25,4±1,6	23,2±1,3	24,8±1,1
<i>L. plantarum</i>	товстий кишечник породіллі	19,5±1,3	30,5±1,2	26,3±1,8	22,5±1,7	18,7±1,3
<i>L. fermentum</i>	товстий кишечник породіллі	18,1±1,1	0,0	22,3±1,5	23,2±1,3	22,4±1,2
<i>L. acidophilus</i>	півховий секрет породіллі	34,7±1,8	41,9±1,2	29,8±1,4	28,8±1,1	44,7±1,7
<i>L. acidophilus</i>	півховий секрет породіллі	19,1±1,4	28,3±1,6	22,5±1,4	20,3±1,8	18,3±1,7

Виділені штами	Джерело виділення	Тест-мікроорганізми				
		Діаметр зони затримки росту, мм				
		<i>S. aureus</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
<i>L. acidophilus</i>	підвковий секрет породіллі	0,0	24,1+1,9	23,2+1,8	0,0	0,0
<i>L. plantarum</i>	підвковий секрет породіллі	19,7+1,4	16,9+1,1	24,1+1,8	20,9+1,6	21,8+1,4
<i>L. agilis</i>	підвковий секрет породіллі	26,6+1,8	21,2+1,8	20,9+1,2	27,4+1,5	19,6+1,2
<i>L. acidophilus</i>	“Наріне”	0,0	20,3+1,6	15,1+1,1	0,0	12,3+1,3

Оскільки метою нашої роботи був спрямований пошук біологічно активних штамів лактобацил, які могли б бути застосовані для нормалізації мікробіоценозу підви жінок репродуктивного віку, відбір штамів слід вести, поєднуючи високу антагоністичну активність з широким спектром антибіотикорезистентності.

У результаті зіставлення антибіотикорезистентності досліджених штамів та їх антагоністичної активності по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів розподілено одержані штами на 3 групи. До першої віднесли штами, стійкі до антибіотиків, проте малоактивні по відношенню до патогенної мікробіоти, до другої — антибіотикочутливі та антагоністично неактивні, до третьої — антибіотикорезистентні та антагоністично активні.

На підставі такого розподілу визначили штами, перспективні для створення пробіотичного препарату: *L. acidophilus* (ізольований з фекалій новонародженого), *L. casei subsp. rhamnosus* (з фекалій новонародженого) та *L. acidophilus* (з підвкового секрету породіллі).

52,9 % усіх виділених штамів лактобацил відносились до облігатно гомоферментативних, 35,2 % — до факультативно гетероферментативних і 11,9% — до облігатно гетероферментативних молочнокислих бактерій.

Література

1. Белова Г. А., Шергин Н. А., Трофимова Т. И. Распространенность штаммов-антагонистов к кишечной палочке среди молочнокислых бактерий // Молочная промышленность. — 1982. — № 5. — С. 19—20.
2. Груздева Т. А., Кулеш Е. М., Ильина Н. К., Ткаченко Л. Ф. Коррекция микрофлоры кишечника искусственно вскармливаемых детей биологически активными добавками // Респ. сб. научн. трудов “Аутофлора человека в норме и патологии и ее коррекция”. — Горький: Мед. ин-т, 1988. — С. 119—124.
3. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. — М.: Высшая школа, 1985. — С. 48—49.
4. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. — М.: Наука, 1975. — 490 с.
5. Коршунов В. М., Кафарская Л. И., Володин Н. Н., Тарабрина Н. П. Коррекция дисбиотических нарушений вагинальной микрофлоры с помощью препарата из высокоадгезивных лактобацилл // Клинич. микробиология. — 1990. — С. 17—18.
6. Леванова Г. Ф., Лихачева А. Ю., Соколова К. Я. Рассмотрение статуса новых видов лактобацилл с применением геномных характеристик // Микробиол. журнал. — 1995. — С. 123—126.
7. Палади Г. А., Мельник Т. И. Нормальная микрофлора половых путей у здоровых женщин репродуктивного возраста и при беременности // Мед. курьер. — 1991. — № 5. — С. 38—43.

8. Приказ № 535 "Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях в лечебно-профилактических учреждениях". — М.: МЗ СССР, 1985. — 121 с.
9. Ратникова И. А., Гаврилова Н. Н., Колоколова Н. Н. Идентификация антибиотических веществ молочнокислых бактерий // Биотехнология. — 1995. — № 5—6. — С. 19—20.
10. Carlson J., Gothefors L. Transmission of lactobacillus jensenii and lactobacillus acidophilus from mother to child at the time of delivery // J. Clin. Microbiol. — 1996. — P. 124—128.
11. Eschenbach D., Davick P., Williaims B. Prevalence of hydrogen peroxide-producing lactobacillus species in normal women and women with bacterial vaginosis // J. Clin. Microbiol. — 1989. — 27. — P. 251—256.
12. Levinson M., Corman L., Carryngton E. and Kaye D. Quantitative microflora of the vagina // Ann. J. Obstetrics. Gynecol. — 1997. — 127. — P. 80—85.
13. Rogosa M. and Sharpe M. Species differentiation of human vaginal lactobacilli // J. Gen. Microbiol. — 1960. — 23. — P. 197—201.

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИБИОТИКО-РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ РОДИЛЬНИЦ И НОВОРОЖДЕННЫХ

Швец А. В., Донцова Т. А., Иваница В. А.

Одесский государственный университет, кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 270026, Украина

Резюме

Выделены и отобраны штаммы лактобацилл, перспективные для создания пробиотических микробных препаратов в целях коррекции микрофлоры влагалища женщин репродуктивного возраста и дисбактериоза кишечника новорожденных. Получены два штамма *Lactobacillus acidophilus* и один штамм *L. casei* subsp. *rhamnosus*, которые объединяют высокую антагонистическую активность с широким спектром антибиотикорезистентности. Штаммы, выделенные из влагалища женщин, проявляли большую антагонистическую активность, чем выделенные из прямой кишки. Штаммы, изолированные от детей, превышали по своей активности как вагинальные, так и ректальные женские.

Ключевые слова: лактобациллы, антагонистическая активность, антибиотикорезистентность.

ANTAGONISTIC PROPERTIES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM MOTHERS AND THEIR INFANTS

Shvets A. V., Dontsova T. A., Ivanitsa V. A.

Odessa State University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 270026, Ukraine

Summary

In the present study isolation and selection of lactobacilli strains for creation of probiotic microbial medicines to correct microflora of women's vagina and intestinal of infants has been carried out. Two strains of *Lactobacillus acidophilus* and one strain of *L. casei* subsp. *rhamnosus* have been isolated. These strains possessed high antimicrobial activity against different urogenital and enteric pathogens and broad spectrum of antibiotic resistance. Lactobacilli strains isolated from women's vagina showed higher antagonistic activity than strains isolated from rectum. Strains isolated from infants' feces exceeded activity of vaginal and rectal samples.

Key words: lactobacilli, antagonistic activity, antibiotic resistance.