

УДК 579.864

Єлинська Н. О., канд. біол. наук, доц., Кур'ята Н. В., асп.,
Фабіянська І. В., асп., Янченко О. І., асп.

Одеський державний університет, кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна.

ТАКСОНОМІЧНИЙ СКЛАД ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ДІТЕЙ, ХВОРИХ НА ДИСБАКТЕРІОЗ

Вивчено біологічні властивості та видовий склад бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих з кишечника дітей, хворих на дисбактеріоз. Досліджено антибіотикорезистентність лактобактерій до антибіотичних препаратів різних груп. Встановлено, що ізольовані бактерії роду *Lactobacillus* характеризуються високою стійкістю до аміноглікозидів та деяких цефалоспоринов. Досліджено антагоністичну активність ізольованих штамів лактобактерій до умовно-патогенних мікроорганізмів, що є етіологічними агентами дисбактеріозу. Відібрано штами лактобацил, що мають антагоністичні властивості та можуть бути рекомендовані як основа пробіотичних препаратів для корекції мікробіоценозу кишечника.

Ключові слова: лактобацили, таксономія, антибіотикорезистентність, антагоністична активність.

Шлунково-кишковий тракт є своєрідною екосистемою. Мікробна популяція шлунково-кишкового тракту являє собою щільну біоболонку, яка покриває ділянки слизового шару та внутрішню поверхню епітелію. Ця екологічна система є досить складною, що сприяє стабільності складу автохтоної мікробіоти (в тому числі і молочнокислих бактерій). Вона має найбільшу питому вагу у нормальній мікробіоті людини та тварин і відповідає за багато життєво важливих функцій організму господаря. До складу нормальної мікробіоти кишечника входить більше 100 видів мікроорганізмів. Лактобацили, що виділяються із фекалій у кількості 10^4 — 10^9 кл/мл, є гомо- та гетероферментативними видами: *Lactobacillus casei subsp. tolerans*, *L. casei subsp. casei*, *L. casei subsp. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* та ін. [3]. Вони грають захисну роль, перешкоджаючи розмноженню умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів та проникненню їх у внутрішнє середовище організму. Нормальне функціонування лактобацил в шлунково-кишковому тракті забезпечують такі їх особливості, як здатність утворювати високоактивні антибактеріальні речовини, широкий спектр органічних кислот та здатність прикріплюватись до слизових оболонок кишечника [1].

Останнім часом спостерігаються значні зрушення в якісному та кількісному складі нормальної мікробіоти організму людини, викликані такими факторами як екологічні негаразди, масове безконтрольне застосування антибіотичних та хіміотерапевтичних препаратів, підвищений радіаційний фон, неповноцінність харчування та ін. [37]. Зміну складу нормальної мікробіоти людини оцінюють як стан дисбактеріозу. При цьому часто визначають кількість представників нормальної мікробіоти, зокрема лактобацил, проте їх видовий склад і вплив на умовно-патогенні та патогенні бактерії практично не досліджують.

У зв'язку з цим метою цієї праці є вивчення видової різноманітності та таксономічного складу бактерій роду *Lactobacillus*, ізольованих від хворих на дисбактеріоз дітей, та встановлення деяких аспектів їх взаємовідносин з умовно-патогенними бактеріями — етіологічними агентами дисбактеріозу.

Матеріал та методи дослідження

Об'єктом дослідження були 23 штами молочнокислих бактерій, ізольованих із кишечника дітей у віці від 1 до 7 років, хворих на дисбактеріоз. Для виділення лактобацил як середовище накопичення використовували знежирене молоко [4], культивували мікроорганізми на середовищі MRS [8]. Для ідентифікації лактобацил за допомогою стандартних методів [5] вивчали наступні властивості: морфологічні (форму, довжину та ширину клітин), тинкторіальні (ставлення до фарбування за методом Грама), культуральні (форму, колір, розмір та інші характеристики колоній), фізіолого-біохімічні (здатність до росту при 37, 41 та 45 °С; ставлення до кисню; здатність утилізувати вуглеводи та багатоатомні спирти; наявність каталазної активності).

Антагоністичну активність лактобацил по відношенню до умовно-патогенних бактерій родів *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Providencia* та *Streptococcus* вивчали методом агарових блоків [2]. Для виключення впливу на тест-організми молочної кислоти в одному із варіантів досліду в середовище як буфер вводили 5% розчин CaCO_3 . Антагоністичну активність вважали низькою, якщо діаметр зон відсутності росту тест-організму навколо блоку з досліджуваним штамом був менше, ніж 20 мм, і високою, якщо діаметр зон перевищував 20 мм.

Чутливість штамів лактобацил до 10 антибіотичних препаратів з групи лінкоміцину, макролідів, аміноглікозидів, цефалоспоринів, а також поліміксину та хлорамфеніколу визначали стандартним методом паперових дисків [2].

Результати досліджень

Для виділення бактерій роду *Lactobacillus* проведено обстеження 25 дітей віком від 1 до 7 років, хворих на дисбактеріоз різної етіології. Від 22 з них ізольовано 23 штами молочнокислих бактерій.

Виділені культури є грампозитивними неспороутворюючими паличками правильної форми, які за розмірами варіюють від довгих паличок (довжина 5—6 мкм, ширина 0,5—0,9 мкм) до кокобацил (довжина 1,1—3 мкм, ширина 0,7—0,8 мкм) з тенденцією до утворення ланцюжків.

На елективному щільному живильному середовищі MRS вивчено культуральні властивості ізольованих штамів. З'ясовано, що виділені штами лактобацил мають невисоку інтенсивність росту, утворюють дрібні (до 2—3 мм в діаметрі), безбарвні, білі або жовтуваті, напівпрозорі, гладкі, опуклі, блискучі колонії.

Для підтвердження належності виділених культур до роду *Lactobacillus* визначали їх здатність до утворення каталази при обробці клітин 3%-ним розчином перекису водню. Показано, що всі культури були каталазонегативними. Визначення вказаних властивостей дозволило віднести ізольовані штами до роду *Lactobacillus*.

Для видової ідентифікації бактерій роду *Lactobacillus* визначали здатність до росту при 45 °С та утилізації вуглеводів і багатоатомних спиртів. Виявлено, що здатними до росту при 45 °С були 39% ізольованих лактобацил. Аналогічні дані наведено у “Визначнику бактерій Бергі”, де сказано, що близько 40% видів лактобацил ростуть при 45 °С [7]. Проте цей показник не наведено в таблицях, які використовуються для ідентифікації лактобацил. На наш погляд, дана ознака може бути додатковим діагностичним критерієм для визначення видової належності досліджуваних штамів.

З'ясовано здатність лактобацил до утилізації 11-ти вуглеводів (моно-, ди- та трисахаридів) і 2-х багатоатомних спиртів. Показано, що досліджувані штами бактерій краще ферментують моносахариди (зокрема, п'ятиатомний цукор — фруктозу та гексози — глюкозу, галактозу і манозу), а також дисахариди (лактозу, мальтозу і сахарозу), ніж трисахариди та багатоатомні спирти (табл. 1).

Таблиця 1

Утилізація вуглеводів та багатоатомних спиртів досліджуваними штамами лактобацил

| Субстрат | Кількість штамів, позитивних за даною ознакою | |
|-----------|---|----------------------------------|
| | Всього | % від загальної кількості штамів |
| Арабіноза | 5 | 21,7 |
| Ксилоза | 7 | 30,4 |
| Фруктоза | 17 | 73,9 |
| Галактоза | 18 | 78,3 |
| Глюкоза | 20 | 86,9 |
| Маноза | 13 | 56,5 |
| Рамноза | 5 | 21,7 |
| Лактоза | 17 | 30,4 |
| Мальтоза | 12 | 52,1 |
| Сахароза | 13 | 56,5 |
| Рафіноза | 15 | 65,2 |
| Манітол | 10 | 43,5 |
| Сорбітол | 7 | 30,4 |

Всі вивчені морфологічні, культуральні, фізіологічні та біохімічні ознаки дозволили встановити видову належність виділених штамів молочнокислих бактерій. Так, 4 штами досліджуваних бактерій було ідентифіковано як *L. gasseri* (1, 41, 66 та 438), 1 штам — *L. fermentum* 61, 3 — *L. brevis* (62/1, 67 та 75), 7 — *L. casei subsp. tolerans* (62/2, 64, 432, 433, 440, 441 та 445), 1 — *L. casei subsp. rhamnosus* 437, 1 — *L. casei subsp. casei* 444, 2 — *L. acidophilus* (63 та 588), 2 — *L. buchneri* (40 та 446), 1 — *L. crispatus* 73 та 1 — *L. reuteri* 434.

Виходячи з літературних даних [7] та результатів власної ідентифікації штамів нами було встановлено типи молочнокислого бродіння у виділених лактобацил. Усі три типи молочнокислого бродіння представлені приблизно однаковою кількістю штамів (табл. 2).

Таблиця 2

Тип молочнокислого бродіння ізольованих штамів лактобацил

| Вид | Число штамів | | Тип молочнокислого бродіння |
|---|--------------|------|-------------------------------------|
| | абс. | % | |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. crispatus</i> | 7 | 30,4 | гомоферментативний |
| <i>L. casei subsp. tolerans</i> <i>L. casei subsp. casei</i> <i>L. casei subsp. rhamnosus</i> | 9 | 39,2 | факультативно-гетеро-ферментативний |
| <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i> | 7 | 30,4 | гетероферментативний |

В окремих дослідках з'ясовували стійкість ізольованих штамів лактобацил до антибіотиків різних груп. Виявлено, що більшість (66—77%) ізольованих штамів була резистентною до цефокситину та аміноглікозидів (неоміцину і тобраміцину); меншою мірою проявлялася стійкість до цефазоліну (44%) та поліміксину (44%). Найменша кількість (11—22%) досліджуваних штамів виявилася чутливою до дії олеандоміцину, кліндаміцину, цефуроксиму та хлорамфеніколу (табл. 3).

Таблиця 3

Кількість антибіотикорезистентних штамів лактобацил

| Група антибіотиків | Назва препарату | Кількість штамів,% |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|
| Макроліди | Олеандоміцин | 11,0 |
| Аміноглікозиди | Неоміцин | 77,0 |
| | Тобраміцин | 66,0 |
| Група лінкоміцину | Кліндаміцин | 22,0 |
| Цефалоспорини | Цефазолін | 44,0 |
| | Цефокситин | 77,0 |
| | Цефуроксим | 22,0 |
| Антибіотики широкого спектру дії | Поліміксин | 44,0 |
| | Хлорамфенікол | 22,0 |

Число антибіотиків, до яких досліджувані штами були стійкими, коливалось від 1 до 7. Так, серед штамів, ізольованих від хворих на дисбактеріоз дітей, у чотирьох штамів *L. casei subsp. tolerans* (штами 441, 440, 432 та 445) було виявлено резистентність до 7, 5, 3 та 1 антибіотика відповідно; *L. casei subsp. casei* 444, *L. casei subsp. rhamnosus* 437, *L. buchneri* 446, *L. gasseri* 438 та *L. reuteri* 434 були стійкими до дії 4 антибіотиків.

Високу стійкість до різних груп антибіотиків більшості штамів лактобацил, ізольованих від хворих дітей, можна пояснити або можливим здобуттям даними штамами плазмід резистентності від клінічних штамів умовно-патогенних бактерій, або здобуттям власної системи резистентності в умовах інтенсивної антибіотикотерапії.

Антагоністичну активність ізольованих штамів лактобацил по відношенню до умовно-патогенних бактерій вивчали з урахуванням впливу продуктів метаболізму, які утворюються при культивуванні бактерій на стандартному середовищі MRS та в умовах, які виключають вплив органічних кислот. Антагоністична дія лактобацил по відношенню до *Klebsiella oxytoca* та *Staphylococcus aureus* була сильнішою за умов, що виключають вплив органічних кислот. По відношенню до *Providencia sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococcus faecalis* органічні кислоти, утворювані лактобацилами, найвірогідніше були головним чинником антагоністичної дії. Досліджувані штами лактобацил не виявляли антагоністичного впливу на *Proteus mirabilis* та *Citrobacter freundii* (табл. 4). Виявлено штами-антагоністи кількох штамів умовно-патогенних бактерій.

Таблиця 4

Антагоністична активність лактобацил по відношенню до умовно-патогенних бактерій, виявлена за різних умов культивування

| Тест-організми | Кількість штамів-антагоністів (%), яких культивували | |
|------------------------|--|--|
| | в стандартних умовах | в умовах, що виключали вплив органічних кислот |
| <i>P. mirabilis</i> | 0 | 0 |
| <i>K. oxytoca</i> | 21 | 29 |
| <i>C. freundii</i> | 0 | 0 |
| <i>Providencia sp.</i> | 43 | 0 |
| <i>E. coli</i> | 57 | 21 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 57 | 14 |
| <i>S. faecalis</i> | 7 | 0 |
| <i>S. aureus</i> | 14 | 35 |

Так, *L. casei subsp. rhamnosus* 437 був активний по відношенню до 5 штамів умовно-патогенних бактерій: *K. oxytoca*, *Providencia sp.*, *E. coli* (гем.), *P. aeruginosa*, *S. faecalis*; *L. acidophilus* 63 та *L. brevis* 62/1 — по відношенню до 4 штамів умовно-патогенних бактерій: *K. oxytoca*, *E. coli* (гем.), *P. aeruginosa*, *S. aureus*; *L. fermentum* 61 — до 3 штамів: *E. coli* (гем.), *P. aeruginosa*, *S. aureus*; *L. casei subsp. tolerans* 62/2 — до 2 штамів: *E. coli* (гем.), *P. aeruginosa*; *L. gasseri* 438 — до 2 штамів: *E. coli* (гем.), *Providencia sp.*; *L. reuteri* 434 — до 2 штамів: *Providencia sp.*, *P. aeruginosa*. Три штами (*L. casei subsp. tolerans* 440, 441 та *L. casei subsp. casei* 444) були активними лише до одного штаму умовно-патогенної бактерії — *Providencia sp.* Треба зазначити, що штами *L. acidophilus* 63 та *L. brevis* 62/1 виявляли високу антагоністичну активність як на стандартному живильному середовищі, так і на середовищі, де виключався вплив органічних кислот на тест-організми, що може свідчити про можливе утворення вторинних метаболітів антибіотичної природи.

Високоактивні штами-антагоністи умовно-патогенних бактерій, за умови подальшого вивчення їх біологічних властивостей, можна рекомендувати для локальної терапії та як виробничі штами для виготовлення пробіотичних препаратів.

Література

1. Воробьев А. А., Абрамов М. А., Бондаренко В. М., Шендеров Б. А. Дисбактериозы — актуальная проблема медицины // Вестник Рос. Акад. медиц. наук. — 1997. — № 3. — С. 4—7.
2. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Высшая школа, 1986. — 448 с.
3. Ленцнер А. А., Тоом М. Ф., Воронина М. Н., Микельсаар М. Э. К методике выделения отдельных видов лактобацилл микрофлоры человека // Лабораторное дело. — 1967. — № 5. — С. 301—302.
4. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями: Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника / Методические указания Минздрава СССР. — М.: Минздрав СССР, 1986. — С. 19.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практ. пособие / Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Изд-во МГУ, 1983. — 215 с.
6. Якушенко М. Н., Гихагансоева Ж. А., Бондаренко В. М. Коррекция амбеном нарушений микробной колонизации кишечника у новорожденных детей с перинатальной патологией // Журн. микробиол. — 1988. — № 1. — С. 77—79.
7. Kandler O., Weiss N. Genus *Lactobacillus* // Bergey's manual of systematic bacteriology / Ed. I. T. Staley et. al. — Baltimore: William and Wilkins, 1986. — V. 2. — P. 1208—1234.
8. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol., 1960. — P. 130—135.

Елинская Н. А., Курьята Н. В., Фабиянская И. В., Янченко О. И.

Одесский государственный университет, кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ ДИСБАКТЕРИОЗОМ

Резюме

Изучены биологические свойства и видовой состав бактерий рода *Lactobacillus*, выделенных из кишечника больных дисбактериозом детей. Определена антибиотикорезистентность лактобактерий к антибиотическим препаратам разных групп. Показано, что изолированные бактерии рода *Lactobacillus* обладают высокой устойчивостью к аминогликозидам и некоторым цефалоспорином. Изучена антагонистическая активность изолированных штаммов лактобактерий в отношении условно-патогенных микроорганизмов, являющихся этиологическими агентами дисбактериоза. Штаммы лактобацилл, обладающие высокоантагонистическими свойствами в отношении данных микроорганизмов, могут быть рекомендованы в качестве основы пробиотических препаратов для коррекции микробиоценоза кишечника.

Ключевые слова: лактобациллы, таксономия, антибиотикорезистентность, антагонистическая активность.

Yelinska N. O., Kuryata N. V., Fabiyanska I. V., Yanchenko O. I.

Odessa State University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

TAXONOMIC COMPOSITION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM CHILDREN WITH DYSBACTERIOSIS

Summary

The species composition and biological properties of bacteria of genus *Lactobacillus* isolated from the intestinal tract of the children with dysbacteriosis has been studied. Antibiotic resistance of lactobacilli has been investigated. It has been shown that the isolated bacteria of genus *Lactobacillus* were characterized by strong resistance to aminoglycosides and some cephalosporines. Antagonistic activity of the isolated strains of lactobacilli against opportunistic microorganisms causing dysbacteriosis has been studied. The strains of lactobacilli which have strong antagonistic activity and may be recommended as the basis of probiotic preparations for intestinal microbiocenosis correction have been selected.

Key words: lactobacilli, taxonomy, antibiotic resistance, antagonistic activity.