

УДК 579.864

Донцова Т. А., асистент, Швець Г. В., асистент,
Іваниця В. О., д-р біол. наук, проф., зав. кафедрою
Одеський державний університет, кафедра мікробіології та вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*

Вивчено антагоністичні властивості штамів лактобацил з використанням методу агарових блоків і лунково-дифузійного методу. Встановлено вклад в антагоністичну активність розглянутих штамів різних речовин: органічних кислот, перексиду водню, інших антимікробних сполук. Обговорюється хімічна природа виявленої бактеріостатичної речовини, що її виділяє штам *Lactobacillus johnsonii* La1.

Ключові слова: лактобацили, антимікробні властивості.

Лактобацили — великий рід бактерій, що включає більше, ніж 50 видів та сотні підвидів. Як компонент нормальної мікробіоти людини, лактобацили продукують велику кількість антимікробних сполук, серед яких — органічні кислоти, перекис водню і бактеріоцини. Антагоністична активність лактобацил відіграє важливу роль у механізмах захисту кишечника і репродуктивної системи від інвазії деяких патогенних мікроорганізмів [7]. Продукція перекису водню деякими штамми лактобацил — це один з механізмів, що дозволяє регулювати вагінальну екосистему [4, 5]. Для селекції лактобацил з метою одержання суперпродуцентів антимікробних препаратів велике значення має визначення антимікробної активності досліджуваних штамів.

В зв'язку з цим метою даної роботи було вивчення антагоністичної активності різних бактерій роду *Lactobacillus*, а також з'ясування природи чинників, що обумовлюють цю активність.

Матеріал та методи

Об'єктами дослідження були 8 штамів лактобацил, включаючи три штамів вагінального походження: *Lactobacillus gasseri* TL093с, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* TL059а, *Lactobacillus acidophilus* UL011b; чотири штамів, виділені з кишечника — *Lactobacillus casei* subsp. *casei* UL004, UL004а, UL007а, *Lactobacillus fermentum* UL007; і один штам, що використовується в промисловому виробництві йогурту, — *Lactobacillus johnsonii* La1.

Антимікробну активність лактобацил визначали з застосуванням методу агарових блоків і лунково-дифузійного методу [12].

Агарові блоки готували, використовуючи 12-годинну культуру лактобацил (1 мл бульйонної культури заливали 8,5 мл розплавленого і охолодженого MRS-агару і після застигання вирізали блоки). Після цього поміщали блоки в лунки, які вирізали в агарі, щойно засіяному індикаторними мікроорганізмами, і інкубували чашки на протязі 18—24 годин. Антимікробну активність визначали,

вимірюючи діаметри зон затримки росту індикаторних організмів навколо агарових блоків (діаметри блоків враховували). Вважали, що мікроорганізм має антимікробні властивості, якщо діаметр зони затримки росту перевищував 2 мм.

Відмінність лунково-дифузійного методу полягає в тому, що бульйонну культуру розкапували в лунки.

Для з'ясування природи антагоністичної дії застосовували різні модифікації досліду: в культуру, що тестували, вносили карбонат кальцію в концентрації 25 мг/мл для інгібування дії кислот; додавали каталазу в кінцевій концентрації 1 мг/мл для виключення антимікробної дії пероксиду водню.

Антимікробні субстанції тестували на термостабільність (підігрівуючи культуральний супернатант при 121 °С 15 хвилин), на рН-стабільність (підвищуючи рН супернатанту від 4.5 до 5.3 і 6.7 доданням 1N NaOH) і на стійкість до дії гідролітичних ферментів. Були використані: протеолітичні ферменти — протеїназа К (2.6 Од/мг), пепсин (16 Од/мг), трипсин (39 Од/мг), α -хемотрипсин (45 Од/мг); ліполітичний фермент — ліпаза (900 Од/мг); гліколітичний фермент — α -амілаза (2.2 Од/мг). Кінцева концентрація ферментів — 1 мг/мл, рН 7.0 (для пепсину рН 3.0).

Результати дослідження та їх аналіз

В результаті дослідження була виявлена антимікробна активність *Lactobacillus gasser* TL093c, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* TL059a, *Lactobacillus acidophilus* UL011b, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* UL004, *Lactobacillus casei* підвид *casei* UL004a, UL007a, *Lactobacillus fermentum* UL007 і *Lactobacillus johnsonii* La1 по відношенню до таких штамів: *Streptococcus agalactiae* NTG/VI, *Streptococcus agalactiae* A909 type Ia, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19145, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Proteus mirabilis* ATCC 70002, *Serratia marcescens* NTG/3, *Enterobacter cloacae* AS/5, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Helicobacter pylori* 865, *Helicobacter pylori* 877, а також по відношенню до дріжджеподібних грибів роду *Candida*: *Candida krusei* ATCC 14243, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida glabrata* ATCC 66032 і *Candida tropicalis* ATCC 13803. Діаметри зон затримки росту представлені в таблиці. Як видно з таблиці, всі застосовані штами лактобацил певною мірою виявляли антагоністичну активність по відношенню до інших бактерій.

Порівнюючи між собою два застосованих методи визначення антагоністичної активності лактобацил, необхідно зазначити, що метод агарових блоків є більш ефективним та репрезентативним у порівнянні з лунково-дифузійним методом.

Щодо природи активного антимікробного чинника, то слід зазначити, що всі штами знижують рН середовища, що, можливо, і є причиною антимікробного впливу лактобацил у більшості випадків. Два штами, а саме *Lactobacillus acidophilus* UL011b і *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* TL059a, очевидно, виділяють у середовище перексид водню. Про це свідчить той факт, що вони втрачають активність після обробки культури каталазою. Нарешті, два штами — *Lactobacillus johnsonii* La1 і *Lactobacillus gasser* TL093c, можливо, є продуцентами бактеріостатичних речовин, в усякому разі їх антагоністична активність зберігалась після обробки культури каталазою і нейтралізації карбонатом кальцію.

Діаметри зон затримки росту індикаторних мікроорганізмів, мм

Індикаторний мікроорганізм	<i>Lactobacillus gasseri</i> TL093c				<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> TL059a				<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> UI004				<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> UI004a			
	Без доба- вок	З додатком каталази		З додатком крейди	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
		1	2													
<i>Streptococcus agalactiae</i> NTG/VI	0	0	0	0	6	2	4	7	7	0	12	12	2			
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909 type Ia	17	17	17	12	8	4	8	13	12	4	10	9	0			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19145	7	7	7	5	10	5	8	8	8	2	7	5	2			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923,	7	7	7	4	6	3	6	8	7	3	7	7	3			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	5	4	4	3	2	0	0	5	5	1	2	0	0			
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 70002	9	9	9	7	6	3	5	0	0	0	0	0	0			
<i>Serratia marcescens</i> NTG/ 3	6	6	6	4	5	0	4	8	7	3	6	6	3			
<i>Enterobacter cloacae</i> AS/ 5	5	5	5	3	4	0	2	0	0	0	0	0	0			
<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018	14	12	12	8	14	3	10	0	0	0	0	0	0			
<i>Helicobacter pylori</i> 865	11	10	10	7	14	4	8	4	4	0	5	4	0			
<i>Helicobacter pylori</i> 877	0	0	0	0	0	0	0	7	6	0	5	5	2			
<i>Candida krusei</i> ATCC 14243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
<i>Streptococcus agalactiae</i> NTG/VI	9	9	9	3	10	10	5	14	4	10	16	14	12			
<i>Streptococcus agalactiae</i> A909 type Ia	9	9	9	2	10	9	4	7	3	5	8	7	6			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19145	3	3	3	0	6	6	2	2	0	0	5	4	3			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923,	3	3	3	0	6	5	3	4	2	3	4	3	2			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	2	0	0	0	5	5	2	0	0	0	3	1	0			

[illegible]

Антимікробні властивості бактерій роду *Lactobacillus* є предметом вивчення дослідників на протязі цілого століття, відтоді як І. І. Мечников вперше висловив гіпотезу про значення молочнокислих бактерій в шлунково-кишковому тракті людини для здоров'я і довголіття [10]. В останні роки з'явилося багато повідомлень про важливість перекис-утворюючих лактобацил у підтриманні нормобіоценозу різних біотопів організму людини [4, 5, 7]. В зв'язку з цим великого значення набуває селекція штамів, здатних активно виділяти перекис водню.

В літературі міститься багато матеріалів про інгібуючий вплив лактобацил на дріжджеподібні гриби роду *Candida*. Колінз [1] опублікував дані про інгібування *Candida albicans* під дією *Lactobacillus acidophilus*, Друз [2] запропонував провадити профілактику кандидозних вагінітів лактобацилами. Хілтон з співавторами [6] пропонує вживання з такою ж метою йогурта, що містить *Lactobacillus acidophilus*. Однак в нашому дослідженні лактобацили, навіть досить активні по відношенню до різних мікроорганізмів, не пригнічували росту жодного з 4-х застосованих штамів *Candida*. Навпаки, в ряді випадків спостерігалася навіть стимуляція росту грибків лактобацилами. В наших більш ранніх дослідженнях [3] були проведені досліди по колонізації вагіни шурів різними штамми лактобацил. В серії цих дослідів ми також не спостерігали інгібування штамів *Candida* лактобацилами.

З метою отримання попередньої інформації про хімічну природу антимікробної речовини, що виділялась у середовище штамом *Lactobacillus johnsonii* La, провели її подальше вивчення. Ця антимікробна субстанція була активна в інтервалі рН від 3 до 5. При підвищенні рН до 5.3 інгібіторна активність втрачалася. Зворотне титрування до більш низьких значень рН призводило до відновлення активності. Нагрівання при 121 °С на протязі 15 хвилин не зменшує активності даної речовини, отже вона є термостабільною (особливо в кислому середовищі). Речовина не втрачала активності після обробки трипсином, протеїназою К, α -хемотрипсином та пепсином, що ставить під сумнів її білкову природу. В протилежність цьому обробка субстанції α -амілазою і ліпазою призводила до повної втрати нею активності.

Антимікробна речовина, що її виділяє штам *Lactobacillus johnsonii* La, є активною проти широкого спектру грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів, хоча не виявляє активності по відношенню до інших лактобацил [11]. Все вище зазначене не дозволяє віднести дану речовину до класу бактеріоцинів. Можна зробити припущення, що за своєю хімічною природою це може бути ліпополісахарид. Функціональні і структурні особливості даної речовини потребують подальшого вивчення.

Література

1. Collins E. B., Hardt P. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus* // J. Dairy Sci. — 1980. — V. 63. — P. 830—832.
2. Druz D. J. *Lactobacillus* prophylaxis for *Candida vaginitis* // Ann. Intern. Med. — 1992. — V. 116. — P. 419—420.
3. Dontsova T. A., Shvets A. V., Ivanitsa V. A., Kilic A. O. Colonization of the rat vagina with *Lactobacilli* // Odessa State University Herald. — 1999. — V. 4, № 3. — P. 104—107.
4. Eschenbach D. A., Davick P. R., Williams B. L. Prevalence of hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis // J. Clin. Microbiol. — 1988. — V. 34. — P. 974—978.
5. Hillier S. L., Krohn M. A., Rabe L. K., Klebanoff S. J., Eschenbach D. A. The normal vaginal flora,

- H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women // Clin. Infect. Diseases. — 1993. — V. 16, № 4. — P. 273—281.
6. Hilton E., Isenberg H. D., Alperstein P., France K., and Borenstein M. T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidial vaginitis // Ann. Intern. Med. — 1992. — V. 116. — P. 353—357.
 7. Ocana V. S., de Ruiz Holgado A. A., Nader-Macias M. E. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 1999. — V. 23, № 2. — P. 87—92.
 8. Kandler O., Weiss N. Genus *Lactobacillus*. In Bergey's Manual of systematic bacteriology. — The Williams and Wilkins Co., Baltimore. — 1986. — V. 2. — P. 1209—1234
 9. Kilic A. O., Pavlova S. I., Wen-Ge Ma, and Tao L. Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt // Applied and Environmental Microbiology. — 1996. — V. 62, № 6. — P. 2111—2116.
 10. Mechnikov I. The prolongation of life // G. P. Putnam's Sons, New York. — 1908. — P. 20—22.
 11. Shvets A. V., Dontsova T. A., Ivanitsa V. A., Kilic A. O. Antimicrobial substance from a dairy lactobacillus strain // Odessa State University Herald. — 1999. — V. 4, № 3. — P. 108—112.
 12. Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria // Bact. Rev. — 1976. — V. 40. — P. 722—756.

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

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

АНТАГОНІСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*

Резюме

Изучены антагонистические свойства восьми штаммов лактобацилл с использованием метода агаровых блоков и луночно-диффузионного метода. Установлен вклад в антагонистическую активность изучаемых штаммов различных веществ: органических кислот, перекиси водорода, других антимикробных соединений. Обсуждается химическая природа выявленного бактериостатического вещества, выделяемого штаммом *Lactobacillus johnsonii* La1.

Ключевые слова: лактобациллы, антимикробные свойства.

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

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

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF BACTERIA OF THE *LACTOBACILLUS* GENUS

Summary

In the present study 8 strains of lactobacilli were investigated for their antagonistic properties. For detection antimicrobial activity, the agar well-diffusion and agar disc-diffusion methods were used. The contribution to antimicrobial activity of different compounds: organic acids, hydrogen peroxide, and other antimicrobial substances have been estimated. The chemical nature of the bacteriostatic compound produced by *Lactobacillus johnsonii* La1 is discussed.

Key words: lactobacilli, antimicrobial properties.