

УДК 579.264

І. В. Фабіянська, асист., **Н. О. Єлинська**, канд. біол. наук, доц.
Одеський національний університет, кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ КИШЕЧНИКА ДІТЕЙ

Досліджували антагоністичну активність штамів лактобацил. Встановлено, що більшість досліджених штамів проявляли слабо або середньо виражену антагоністичну активність по відношенню до умовно-патогенних, сапрофітних бактерій та дріжджеподібних грибів. Виявлено, що домінуючу роль у пригніченні росту індикаторних мікроорганізмів відіграє молочна кислота, яка продукується ізольованими штамми лактобацил.

Ключові слова: лактобацили, антагоністична активність.

Останнім часом широким фронтом провадяться роботи по створенню біологічно активних препаратів для корекції мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту людини [1, 2]. При розробці біопрепаратів для профілактики шлунково-кишкових захворювань велике значення має підбір активних штамів бактерій, здатних пригнічувати розвиток патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів та відновлювати нормальну мікробіоту кишечника [3, 4, 5].

Актуальним є створення пробіотичних препаратів на основі індигенних мікроорганізмів, які в нормі зустрічаються в шлунково-кишковому тракті здорового організму. Однак, стандарти нормальної мікробіоти для мешканців різних регіонів з різноманітною дієтою варіюють. Пробіотичні препарати, до яких входять штами бактерій, ізольованих із вмісту шлунково-кишкового тракту людей, які мешкають у даній місцевості, на нашу думку, мають виявляти більш виразний терапевтичний ефект, ніж колекційні штами і штами, вилучені в інших регіонах. Тому, на наш погляд, пошук антагоністично-активних культур має проводитися серед штамів, характерних для даної екологічної ніші.

Метою даної роботи було вивчення антагоністичної активності штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із кишечника дітей — мешканців м. Одеси, по відношенню до умовно-патогенних і сапрофітних бактерій, а також дріжджеподібних грибів.

Матеріал та методи дослідження

Матеріалом дослідження слугували 67 штамів лактобацил, виділених із шлунково-кишкового тракту дітей і колекційний штам *L. fermentum* ATCC 14931. Штами молочнокислих бактерій вирощували на середовищі MRS [6], індикаторні штами умовно-патогенних і сапрофітних бактерій — на МПА [7], індикаторні штами дріжджепо-

дібних грибів — на середовищі Сабуро [7]. Антагоністичну активність лактобацил визначали методом агарових блоків і оцінювали в міліметрах [8]. Для з'ясування природи антагоністичної дії використовували дві модифікації досліду: 1 — в середовище MRS для нейтралізації дії молочної кислоти додавали карбонат кальцію в концентрації 25 мг/мл; 2 — для інактивації перекису водню в середовище MRS вносили каталазу в кінцевій концентрації 1 мг/мл.

Індикаторними мікроорганізмами слугували 6 колекційних штамів умовно-патогенних і сапрофітних бактерій: *Escherichia coli* УКМ В-906, *Bacillus subtilis* ОГУ-24, *Pseudomonas aeruginosa* ОГУ-211, *Proteus vulgaris* УКМ В-905, *Staphylococcus aureus* ОГУ-223, *Micrococcus luteus* УКМ АС-645^T, а також 6 колекційних штамів дріжджеподібних грибів: *Rhodotorula bogoriensis* УКМ У-50^T, *Saccharomyces cerevisiae* УКМ У-497, *Candida utilis* УКМ У-1597^T, *Candida albicans* УКМ У-2501^T, *Cryptococcus neoformans*, *Nocardia asteroides* УКМ У-405^T.

Результати досліджень

За вивчення антагоністичної активності штамів лактобацил, ізольованих із вмісту кишечника дітей, встановлено, що досліджені штами володіють слабко або середньо вираженими антагоністичними властивостями по відношенню до індикаторних мікроорганізмів. Було виявлено, що по відношенню до таких умовно-патогенних мікроорганізмів як *E. coli* і *B. subtilis* більшість виділених штамів молочнокислих бактерій антагоністичну активність не проявляли або проявляли дуже слабко (табл. 1).

Відсутність антагоністичної активності по відношенню до кишкової палички можна розцінювати як позитивний факт. Є підстави вважати, що використання в подальшому досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* як основи пробіотичних препаратів не буде супроводжуватися порушенням складу нормальної мікробіоти кишечника.

Приблизно 50 % штамів бактерій роду *Lactobacillus* пригнічували ріст *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, проте діаметри затримки росту індикаторних культур були менші 10 мм. Тільки для трьох штамів лактобацил виявлено середній рівень антагоністичної активності по відношенню до *P. vulgaris*, для одного — по відношенню до *P. aeruginosa*.

По відношенню до *M. luteus*, представнику нормальної мікробіоти шкірних покривів людини, 27,7% досліджуваних штамів лактобацил проявили низький, 21,5% — середній і 6,0% — високий рівень антагоністичної активності.

В даних дослідженнях показано, що у порівнянні з умовно-патогенними і сапрофітними бактеріями, штами лактобацил проявили більшу антагоністичну активність по відношенню до індикаторних штамів дріжджеподібних грибів.

Виявилося, що штами лактобацил проявили слабку антагоністичну дію відносно штамів *R. bogoriensis*, *C. utilis*, *C. albicans*; слабку, середню

та високу — відносно штамів *S. cerevisiae* і *C. neoformans*; середню і високу — відносно штаму *N. asteroides*.

Таблиця 1

Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus*

Індикаторний мікроорганізм	Антагоністична активність					
	Слабка (<10 мм) ¹		Середня (10-20 мм)		Висока (>20 мм)	
	абс	%	абс	%	абс	%
<i>Escherichia coli</i>	11 ²	16,9	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	50,8	0	0	1	1,5
<i>Proteus vulgaris</i>	41	63,1	3	4,6	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	10,8	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	46,2	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	18	27,7	14	21,5	4	6,0
<i>Nocardia asteroides</i>	28	43,1	23	35,4	2	3,1
<i>Rhodotorula bogoriensis</i>	9	13,8	1	1,5	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	12,3	6	9,2	8	12,3
<i>Candida utilis</i>	11	16,9	0	0	1	1,5
<i>Candida albicans</i>	8	12,3	5	7,7	1	1,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	14	21,5	3	4,6	2	3,1

Примітки: 1 — діаметр зони затримки росту індикаторного мікроорганізму

2 — кількість штамів, які пригнічували ріст індикаторного мікроорганізму

Було встановлено, що найбільшу антагоністичну активність відносно використаних умовно-патогенних мікроорганізмів виявили такі штами, як: *L. viridescens* 15, *L. kefir* 289, *L. casei s/sp tolerans* 290, *L. acidophilus* 291, *L. delbrueckii s/sp bulgaricus* 432, *L. delbrueckii s/sp bulgaricus* 444, *L. curvatus* 904, *L. delbrueckii s/sp lactis* 918, *L. delbrueckii s/sp lactis* 921, *L. plantarum* 991, *L. delbrueckii s/sp bulgaricus* 823, *L. fermentum* ATCC 14931 (табл. 2).

Антагоністична активність лактобацил обумовлена дією різних речовин, які синтезуються бактеріями, а також продуктами метаболізму, таких як молочна кислота, перекис водню, лізоцим, антибактеріальні сполуки, бактеріоцини [8, 9, 10].

Для встановлення природи антагоністичної активності досліджуваних бактерій, була проведена модифікація дослідів з додаванням в середовище культивування каталази для нейтралізації дії перекису водню, що продукується лактобацилами і з карбонатом кальцію для нейтралізації дії основного метаболіту лактобацил — молочної кислоти. На підставі отриманих даних, можна зробити висновок, що при проведенні експерименту з каталазою, показники антагоністичної активності вилучених штамів знизились не значно, що свідчить про не стільки важливу роль перекису водню в пригніченні мікробіоти, з якої конкурують лактобацили (табл. 3).

Таблиця 2
 Пригнічення росту індикаторних мікроорганізмів окремими штамами лактобацил у стандартних умовах

Штам	Діаметр зони затримки росту індикаторних мікроорганізмів, мм											
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>R. dogoriensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>N. asteroides</i>
<i>L. viridescens</i> 15	0	0	6	6	0	>20	2	3	0	3	11	10
<i>L. kefir</i> 289	0	0	0	0	3	0	0	>20	2	20	17	9
<i>L. casei</i> s/sp <i>tolerans</i> 290	0	1	>20	9	0	2	3	>20	2	20	9	10
<i>L. acidophilus</i> 291	0	0	7	6	2	>20	0	2	1	0	3	4
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>bulgaricus</i> 432	0	0	0	6	0	0	17	>20	>20	>20	>20	19
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>bulgaricus</i> 444	0	0	4	0	0	>20	3	>20	7	0	5	12
<i>L. curvatus</i> 904	1	0	4	8	0	>20	0	16	3	2	1	16
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>lactis</i> 918	0	0	5	5	1	0	0	>20	0	11	3	>20
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>lactis</i> 921	0	0	4	7	0	8	0	2	3	1	4	>20
<i>L. plantarum</i> 991	0	0	1	4	0	8	0	>20	0	3	4	20
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>bulgaricus</i> 823	4	0	7	5	5	11	0	>20	1	2	2	10
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	0	0	3	0	0	12	0	0	0	4	>20	19

Таблиця 3

Пригнічення росту індикаторних мікроорганізмів окремими штамами лактобацил у досліді з додаванням каталази та карбонату кальцію

Штам	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>R. bogoriensis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>N. asteroides</i>
<i>L. viridescens</i> 15	0/0	0/0	0/4	0/0	0/0	0/11	0/1	0/3	0/0	0/3	0/1	3/1
<i>L. kefir</i> 289	0/0	0/0	0/0	0/0	0/2	0/0	0/0	0/19	0/1	0/19	0/15	0/7
<i>L. casei</i> s/sp <i>tolerans</i> 290	0/0	0/0	0/20	0/8	0/0	0/1	0/3	0/20	0/1	0/20	0/9	0/9
<i>L. acidophilus</i> 291	0/0	0/0	0/5	0/5	0/2	0/20	0/0	0/1	0/1	0/0	0/3	0/4
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>bulgaricus</i> 432	0/0	0/0	0/0	0/6	0/0	0/0	0/17	0/20	0/20	0/20	0/20	0/17
<i>L. delbrueckii</i> s/sp <i>bulgaricus</i> 444	0/0	0/0	0/2	0/0	0/0	0/19	0/1	0/20	0/7	0/0	0/4	0/12
<i>L. curvatus</i> 904	0/1	0/0	0/2	0/6	0/0	0/20	0/0	0/16	0/2	0/2	0/1	0/15
<i>L. delbrueckii</i> s.sp <i>lactis</i> 918	0/0	0/0	0/5	0/4	0/1	0/0	0/0	0/20	0/0	0/11	0/3	0/20
<i>L. delbrueckii</i> s.sp <i>lactis</i> 921	0/0	0/0	0/3	0/7	0/0	0/8	0/0	0/1	0/3	0/1	0/4	0/20
<i>L. plantarum</i> 991	0/0	0/0	0/1	0/3	0/0	0/8	0/0	0/19	0/0	0/3	0/3	0/18
<i>L. delbrueckii</i> s.sp <i>bulgaricus</i> 823	0/4	0/0	0/6	0/5	0/4	0/9	0/0	0/20	0/1	0/1	0/2	0/10
<i>L. fermentum</i> ATCC 14931	0/0	0/0	0/2	0/0	0/0	0/12	0/0	0/0	0/0	0/4	0/20	0/16

Примітки: перша цифра — діаметр зони затримки росту при додаванні каталази, мм;
друга цифра — діаметр зони затримки росту при додаванні карбонату кальцію, мм

Під час досліду з карбонатом кальцію, доданому у середовище для нейтралізації дії молочної кислоти, зони затримки росту спостерігались тільки відносно представника актиноміцетів — *N. asteroides* у п'яти штамів лактобацил, до того ж, зони затримки росту не перевищували 10 мм, тобто спостерігався слабкий ступінь антагоністичної активності, що свідчить про те, що більшість штамів бактерій роду *Lactobacillus* не продукують речовини з бактеріоцидною дією (табл. 3).

Таким чином, встановлено природу антагоністичної активності бактерій роду *Lactobacillus*. Виявилось, що молочна кислота та інші органічні кислоти, які продукуються молочнокислими бактеріями і знижують рН середовища, відіграють домінуючу роль у пригніченні росту умовно-патогенних і дріжджеподібних грибів; щодо перекису водню та бактеріоцидних сполук, то їх роль у пригніченні росту мікроорганізмів-конкурентів лактобацил є незначною, що підтверджується даними літератури [9, 10].

Висновки

1. Антагоністичну активність штамів бактерій роду *Lactobacillus*, вилучених з вмісту шлунково-кишкового тракту дітей — мешканців міста Одеси, по відношенню до штамів умовно-патогенних і сапрофітних бактерій, а також дріжджеподібних грибів оцінено як слабку або середню.
2. Домінуючу роль в пригніченні росту індикаторних мікроорганізмів відіграє молочна та інші органічні кислоти, що продукуються штамми лактобацил.

Література

1. *Беляев В. И.* Пути усовершенствования препаратов, нормализующих микрофлору кишечника // Аутофлора человека в норме и патологии и ее коррекция: Респ. Сб. научных трудов. / Под ред. И. Н. Блохиной, К. Я. Соколовой — Горький: Мед. ин-т, 1998. — С. 74—85.
2. *Коршунов В. М.* Проблемы регуляции микрофлоры кишечника // ЖМЭИ. — 1995. — № 3. — С. 48—55.
3. *Бондаренко В. М., Рубакова Э. И., Лаврова В. А.* Иммуностимулирующее действие лактобацилл, используемых в качестве препаратов-пробиотиков // ЖМЭИ. — 1998. — № 5 — С. 107—112.
4. *Гриневич А. Г.* Молочнокислые бактерии. Селекция промышленных штаммов. — М.: Высшая школа, 1981. — 164 с.
5. *Карпунина Т. И., Горовиц Э. С., Чиненкова А. Н.* Повышение эффективности терапевтического действия пробиотиков // ЖМЭИ. — 1998. — № 2. — С. 104—107.
6. *Kandler Otto, Weiss Norbert.* Section 14. Regular, nonsporing Gram-positive rods. / *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Ed. I. T. Staley et al., V. 1 — Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1989. — P. 1208—1234.
7. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М. О. Бюргера — М.: Медицина, 1982. — С. 72—84.
8. *Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W.* Bacteriocins of Gram-positive bacteria // *Bact. Rev.* — 1976. — V. 40. — P. 722—756.

9. Бажанов Л. Г., Бондаренко В. М., Лыкова Е. А., Огай Д. К. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori* // ЖМЭИ. — 1997. — № 3. — С. 89—92.
10. Донцова Т. А., Швець Г. В., Іваниця В. О. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus* // Вісник Одеського державного університету. — 2000. — Т. 5, Вип. 1. — С. 235—240.

И. В. Фабиянская, Н. А. Елинская

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

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНИКА ДЕТЕЙ

Резюме

Изучена антагонистическая активность штаммов лактобацилл. Определено, что исследованные штаммы проявляют слабо или средне выраженные антагонистические свойства по отношению к условно-патогенным, сапрофитным бактериям и дрожжеподобным грибам. Выявлено, что доминирующую роль в угнетении роста индикаторных микроорганизмов играет молочная кислота, продуцируемая изолированными штаммами лактобацилл.

Ключевые слова: лактобациллы, антагонистическая активность.

I. V. Fabiyanska, N. O. Yelinska

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanska St., 2, Odesa, 65026, Ukraine

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTOBACILLI STRAINS ISOLATED FROM CHILDREN INTESTINE

Summary

It has been studied the antagonistic activity of lactobacilli strains. It has been determined that investigated strains have low or moderate antagonistic properties to facultative-pathogenic, saprophytic bacteria and yeastlike fungi. Found out that lactic acid producing by isolated lactobacilli strains play predominate role in growth decreasing of microorganism-indicators.

Keywords: lactobacilli, antagonistic activity.