

УДК 579.825.11:579.842.11:576.52:579.264

І. Г. Царук'янова¹, асп., І. Б. Сорокулова¹, ст. наук. співроб.,А. І. Осадча¹, ст. наук. співр., Н. О. Єлинська², доц.¹ Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

² Одеський національний університет ім. І. І. Мечнікова,

кафедра мікробіології і вірусології,

Шампанський пров., 2, Одеса, 65058, Україна

АНТАГОНІСТИЧНІ ТА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ

Штами *Bacillus subtilis* УКМВ-5007 і *Escherichia coli* М 17 є перспективними для створення комплексного пробіотика. Вивчали антагоністичну та адгезивну властивості досліджуваних штамів, а також їх асоціативної культури, в залежності від умов культивування.

Ключові слова: *Bacillus subtilis* УКМВ-5007, *Escherichia coli* М 17, адгезія, антагоністична активність.

Значне погіршення екологічної обстановки, збільшення стресових ситуацій, а також масове використання хіміотерапевтичних препаратів — ось фактори, що негативно впливають на склад нормобіоти людини, викликаючи тим самим дисбіоз шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Одним з ефективних засобів для ліквідації цих порушень і покращення травлення є біотерапія за допомогою пробіотиків.

Пробіотики — препарати, виготовлені з живих мікробних культур, представників резидентної або транзиторної мікробіоти. Основні механізми захисту макроорганізму від колонізації патогенними і умовно-патогенними видами мікроорганізмів, що здійснюються представниками нормобіоти, це конкуренція за специфічні місця зв'язування з рецепторами епітеліальних клітин та виражений антагонізм, направлений проти патогенів [1, 2, 3]. Саме тому одними з найважливіших характеристик штамів при відборі їх з метою використання для отримання біопрепаратів є антагоністична та адгезивна властивості.

Метою роботи було виявлення оптимального співвідношення клітин штамів *B. subtilis* і *E. coli* для прояву високої антагоністичної активності по відношенню до тест-культур патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а також дослідження адгезивних властивостей цих штамів в моно- та асоціативній культурі за різних умов культивування.

Матеріали і методи дослідження

Роботу проводили на базі Державного науково-дослідного інституту стандартизації і контролю медичних біологічних препаратів імені

Л. А. Тарасевича Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації та Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Об'єктами дослідів були штами *B. subtilis* УКМ В-5007 і *E. coli* М 17 — складові препаратів біоспорину і колібактерину, що використовуються для профілактики і лікування дисбіозів шлунково-кишкового тракту [5].

Штами бактерій вирощували на тужавому поживному середовищі, змивали забуференим фізіологічним розчином, готували суспензії клітин з концентрацією $0,5 \cdot 10^9$ кл/мл та змішували у співвідношеннях 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1.

Антагоністичні властивості штамів бактерій та їх асоціативних культур по відношенню до тест-культур *Staphylococcus aureus* 209, *E. coli* 028, *Candida albicans* 690, *Salmonella typhimurium* 11, *Proteus vulgaris* U-8, *Citrobacter* sp. D 28, *Serratia* sp. D 52, *Pseudomonas aeruginosa* 4141, *Staphylococcus aureus* D 7, *Streptococcus faecium* D 48, *Enterobacter* sp. D 7, *E. coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* 36/59, *Klebsiella oxytoca* D 45, *Candida albicans* D 69 досліджували за допомогою методу відстроченого антагонізму [6]. Всі вище перераховані штами були виділені від дітей, страждаючих на дисбіоз ШКТ. Отримані дані порівнювали з контролем — зонами затримки росту в мм тих самих тест-культур окремими штамами *E. coli* і *B. subtilis*.

Вивчення адгезивних властивостей штамів мікроорганізмів та їх асоціації у співвідношенні 1:1 здійснювали на моделі клітин макроорганізму — формалінізованих еритроцитах крові людини 0/1 групи Rh(+). Для глибинного культивування використовували синтетичне середовище М-9 [7]. Залежно від поставлених цілей досліді отримані суспензії відмивали або не відмивали від метаболітів за допомогою центрифугування і змішували з еритроцитами крові у співвідношенні 1:1. Для оцінки адгезивних властивостей мікроорганізмів використовували середній показник адгезії (СПА), який вираховували за середнім числом мікроорганізмів на поверхні одного еритроцита. Підраховували еритроцити в п'яти полях зору [8].

Із всієї кількості підрахованих еритроцитів визначали відсоток клітин, що несли на своїй поверхні клітини бактерій (коефіцієнт К).

Використовуючи значення СПА і коефіцієнта К, підраховували індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) за такою формулою:

$$ІАМ = \frac{СПА \cdot 100\%}{К},$$

Згідно даних В. І. Бріліса та співавт. [9], мікроорганізми вважали неадгезивними при $ІАМ < 1,75$, низькоадгезивними при $ІАМ$ від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними — від 2,51 до 4,0 і високоадгезивними при $ІАМ > 4$ [8].

Статистичну обробку отриманих результатів з обчисленням середніх арифметичних даних, їх довірчих інтервалів та ступеня вірогідності провадили за допомогою комп'ютерної програми MS Excell 7.0.

Результати дослідження

Відомо, що бактерії роду *Bacillus* характеризуються високою антагоністичною активністю завдяки антибіотичним сполукам, що продукують, здатні пригнічувати патогенну мікробіоту, яка викликає дисбіоз ШКТ [5]. В наших експериментах при порівнянні значень цього важливого показника досліджуваного штаму *B. subtilis* УКМВ-5007 зі штамом *E. coli* М 17 видно, що культура бацил дійсно характеризується більш вираженим антагонізмом до обраних тест-культур (табл. 1).

Таблиця 1

Прояв антагоністичної активності штамами *Bacillus subtilis* УКМВ- 5007 і *Escherichia coli* М 17 до умовно патогенних та патогенних тест-культур мікроорганізмів

Співвідношення <i>B.subtilis</i> : <i>E.coli</i>	Зона затримки росту тест-культур, мм (M ± m)			
	<i>Salmonella typhimurium</i> 11	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<i>Escherichia coli</i> 028	<i>Candida albicans</i> 690
1 : 1	12,2 ± 1,8	23,8 ± 2,7	19,2 ± 2,4	23,1 ± 1,8
1 : 2	10,1 ± 1,4	20,1 ± 1,4	16,3 ± 2,1	23,3 ± 1,9
1 : 4	9,3 ± 1,0	14,7 ± 1,4	14,4 ± 1,4	18,5 ± 1,4
2 : 1	12,5 ± 1,9	21,3 ± 1,4	17,8 ± 1,6	21,7 ± 1,5
4 : 1	15,4 ± 1,5	23,6 ± 2,1	19,1 ± 1,5	24,1 ± 2,5
<i>B. subtilis</i> (контроль)	9,5 ± 1,3	22,2 ± 1,5	16,2 ± 1,1	21,2 ± 2,3
<i>E. coli</i> (контроль)	6,1 ± 0,5	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0

Зони затримки росту всіх досліджуваних тест-культур чистою культурою бацил значно перевищували аналогічні дані для *E. coli*. До культури *C. albicans* 690 кишкова паличка взагалі не проявляла активності. Антагоністична активність штамів *B. subtilis* УКМВ-5007 та *E. coli* М 17 при їх використанні в асоціативній культурі зберігалась при всіх застосованих співвідношеннях клітин цих штамів. Крім цього, у змішаній культурі зона затримки росту тест-культур у порівнянні до контролю *B. subtilis* зросла на 2—3 мм, а *E. coli* — на 6—15 мм. При збільшенні вмісту клітин бацил в змішаній культурі (співвідношення 2 : 1 і 4 : 1) зона затримки росту тест-культур в порівнянні зі співвідношенням 1 : 1 суттєво не змінювалась, а при збільшенні вмісту клітин *E. coli* (співвідношення 1 : 2, 1 : 4) ця зона зменшувалась. Таким чином, можна зробити висновок, що *B. subtilis* і *E. coli* в асоціативній культурі характеризувались більш високою антагоністичною активністю, ніж окремі культури тих самих штамів. Для подальшого підтвердження одержаних результатів щодо активності відібраного співвідношення 1 : 1 було використано більш розширений спектр тест-культур.

З рисунка 1 видно, що культура бацил проявляла більшу, ніж кишкова паличка, антагоністичну активність до штамів *P. vulgaris* U-8, *Citrobacter sp.* D 28, *Serratia sp.* D 52, *S. aureus* D 7, *Enterobacter sp.* D 7, *S. flexneri* 36/59. Кишкова паличка виявилась більш активною до культур *P. aeroginosa* 4141, *S. faecium* D 48, *Enterobacter sp.* D 7, *E. coli* ATCC 25922, *K. oxytoca* D 45, *C. albicans* D 69.

У п'яти випадках з 11 антагоністична активність асоціативної культури значно перевищувала активність штамів у монокультурі. У випадку з *S. aureus* D 7 активність асоціативної культури була менша за таку у бацил, але більша, ніж у кишкової палички. По відношенню до *K. oxytoca* D 45 і *C. albicans* D 69 активність асоціативної культури була вища за таку у бацил, але нижча ніж в *E. coli*. В інших випадках показники антагоністичної активності бактерій в асоціативній культурі були на 2—4 мм нижчі, ніж у монокультурі.

Виходячи з поставленої мети створення комплексного препарату — пробіотику, наступною, не менш важливою частиною роботи була перевірка здатності досліджуваних штамів до адгезії як в моно-, так і в асоціативній культурі. В ході проведених досліджень було виявлено, що для бацил був характерним нульовий (ІАМ $1,3 \pm 0,03$, К $22,3 \pm 3,1$), а для кишкової палички — середній ступінь адгезії (ІАМ $3,4 \pm 0,4$, К $71,3 \pm 12,7$). Отримані дані узгоджуються з літературними [4, 5, 9].

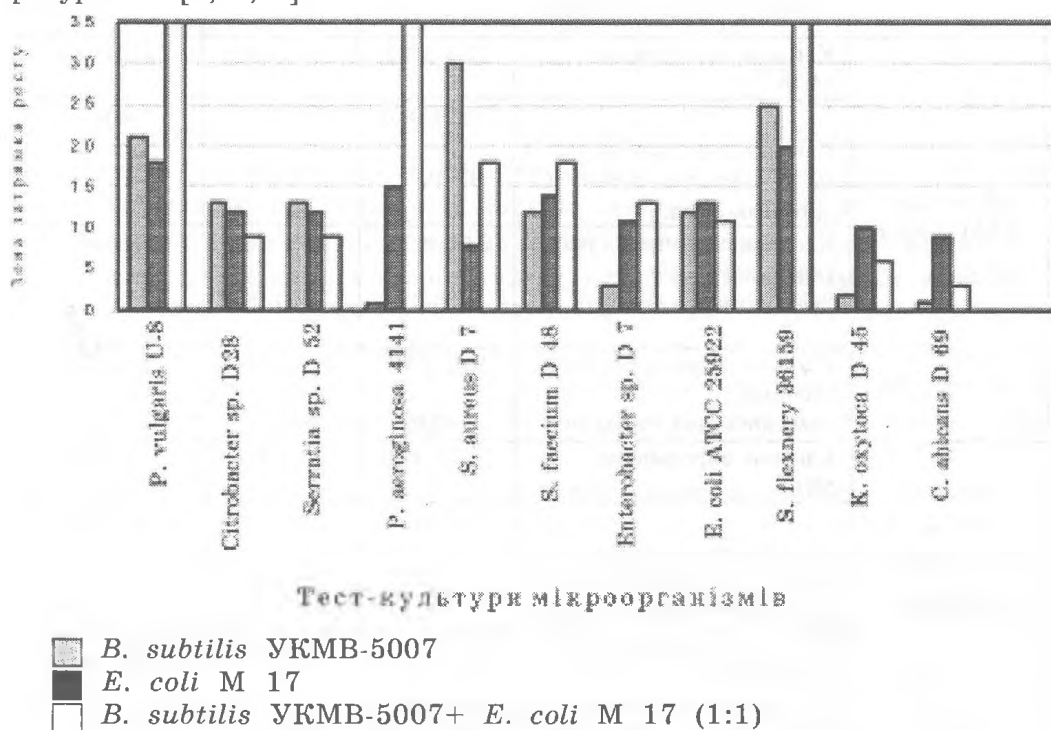


Рис. 1. Антагоністична активність штамів *Bacillus subtilis* УКМВ-5007 і *Escherichia coli* M-17 по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів

При зміні умов культивування показники ІАМ для обох штамів коливались незначно (табл. 2). Так, для добової культури *B. subtilis*, вирощеної в умовах глибинного культивування і відмитої від продуктів метаболізму, ІАМ дорівнював $1,4 \pm 0,09$; при цьому в процесі адгезії приймало участь $31,6 \pm 5,3$ % клітин крові. При інкубуванні з еритроцитами крові клітин, не відмитих від продуктів метаболізму, показник ІАМ практично не змінювався і складав $1,3 \pm 0,19$, але кількість клітин, що брали участь у процесі адгезії, значно зменшувалася — до $20,2 \pm 4,5$ %.

Показники ІАМ і К для клітин штаму *E. coli*, вирощених в глибинних умовах культивування і відмитих від продуктів метаболізму, складали $3,2 \pm 0,8$ і $72,9 \pm 20,7$ %. Однак, для культури, клітини якої не були відмиті від метаболітів, адгезивні властивості знижувалися до $2,5 \pm 0,6$ і $69,0 \pm 10,2$ % відповідно. При прогріванні клітин показники адгезії змінювалися несуттєво.

Таблиця 2

Показники адгезивної активності досліджуваних штамів *Bacillus subtilis* і *Escherichia coli* на моделі еритроцитів крові людини за різних умов культивування

Штам	Умови отримання добової культури клітин бактерій	К ($M \pm m$), %	ІАМ ($M \pm m$)	Ступінь адгезивності
<i>B. subtilis</i> УКМ В 5007	Клітини, вирощені на МПА	$22,3 \pm 3,1$	$1,3 \pm 0,03$	нульова
	Клітини, вирощені на МПА та прогріті при 60 °С протягом 1 год.	$73,0 \pm 9,04$ P < 0,01	$2,0 \pm 0,4$ P = 0,95	низька
	Клітини, отримані за умов глибинного культивування, відмиті	$31,6 \pm 5,3$ P = 0,87	$1,4 \pm 0,09$ P = 0,55	нульова
	Клітини, отримані за умов глибинного культивування, не відмиті	$20,2 \pm 4,5$ P = 0,08	$1,3 \pm 0,19$ P = 0,13	нульова
<i>E. coli</i> M17	Клітини, вирощені на МПА	$71,3 \pm 12,7$	$3,4 \pm 0,4$	середня
	Клітини, вирощені на МПА та прогріті при 60 °С протягом 1 год.	$94,9 \pm 0,7$ P = 0,94	$3,6 \pm 0,09$ P = 0,42	середня
	Клітини, отримані за умов глибинного культивування, відмиті	$72,9 \pm 20,7$ P = 0,06	$3,2 \pm 0,8$ P = 0,14	середня
	Клітини, отримані за умов глибинного культивування, не відмиті	$68,7 \pm 10,2$ P = 0,13	$2,5 \pm 0,6$ P = 0,77	середня

Таким чином, з отриманих результатів видно, що умови культивування практично не впливали на показники адгезії штамів бактерій, в той час як продукти метаболізму штаму *E. coli* значно подавляли його здатність до адгезії, можливо, за рахунок того, що екранували специфічні адгезини досліджуваного штаму. Для кишкової палички характерна наявність таких структур, що зв'язуються з рецепторами епітеліальних клітин. Вони поділені на декілька типів і значно відрізняються за складом у патогенних и непатогенних ешеріхій. Очевидно, саме їх наявність дозволяє кишкової паличці проявляти високу адгезивну активність і успішно конкурувати з патогенними видами ентеробактерій за місця з'ясування [2, 10].

Для штаму *B. subtilis* такої залежності не було виявлено, але показники ІАМ і К для клітин бацил, що були прогріті перед інкубуванням при високих значеннях температур, були значно вищі показників, отриманих за інших умов. У цьому випадку в суспензії відсутні живі клітини, тому можна припустити, що адгезивність штаму залежить від наявності в суспензії специфічних речовин, які й обумовлюють прикріплення клітин. На користь цього припущення свідчать дані, що є в літературі. Відомо, що для бацил характерна наявність значної кількості вуглеводних рецепторів, які можуть забезпечувати прикріплення до клітин макроорганізму [11].

В наших експериментах при інкубуванні суміші клітин бактерій з еритроцитами досліджувані штами активували значно більшу кількість клітин крові. Крім того, специфічні адгезини *E. coli*, що знаходились в метаболітах, були здатні стимулювати адгезивність бацил, тоді як метаболіти штаму *B. subtilis*, навпаки, інгібували адгезивність культури *E. coli*. Було показано, що при додаванні клітин кишкової палички до суміші еритроцитів з клітинами штаму *B. subtilis*, що була попередньо інкубована протягом 40 хв., показники адгезії для бацил не змінювалися. При додаванні до суміші клітин штаму *E. coli* і еритроцитів, що також була преінкубована протягом 40 хв., клітин і метаболітів бацил адгезивні властивості кишкової палички зменшувалися (табл. 3).

Підсумовуючи одержані результати, можна зробити висновок, що досліджувані штами бактерій доповнюють один одного за спектром антагоністичної активності і мають принципово різні механізми дії на організм людини та тварини. Показано, що досліджуваний штам *E. coli* М 17 мав середній ступінь адгезивності, в той час як *B. subtilis* УКМВ-5007, навпаки, — дуже низький, близький до нульового, ступінь по відношенню до клітин крові людини. При створенні змішаної культури досліджуваних штамів бактерій індекси адгезивності дещо знижувались, але значно збільшувалась кількість клітин, які приймали участь у процесі адгезії.

Таблиця 3

Показники адгезивної активності за різних умов інкубування змішаної культури штамів *Bacillus subtilis* і *Escherichia coli* з еритроцитами крові людини

Штам	Умови інкубування клітин бактерій з еритроцитами крові людини	К (M ± m), %	IAM (M ± m)	Ступінь адгезивності
<i>B. subtilis</i> УКМВ 5007	Клітини <i>B. subtilis</i> з метаболітами штаму <i>E. coli</i>	56,2 ± 2,1 P < 0,01	1,8 ± 0,05 P < 0,01	низька
	Клітини <i>B. subtilis</i> з додаванням суспензії клітин <i>E. coli</i> після 40 хв. інкубування	62,2 ± 12,8 P = 0,99	1,4 ± 0,4 P = 0,23	нульова
	Клітини <i>E. coli</i> з додаванням суспензії клітин <i>B. subtilis</i> після 40 хв. інкубування	35,4 ± 15,1 P = 0,61	1,4 ± 0,1 P = 0,4	нульова
<i>E. coli</i> М 17	Клітини <i>E. coli</i> з метаболітами <i>B. subtilis</i>	78,0 ± 6,4 P = 0,38	2,6 ± 0,3 P = 0,88	середня
	Клітини <i>B. subtilis</i> з додаванням суспензії клітин <i>E. coli</i> після 40 хв. інкубування	72,8 ± 6,1 P = 0,08	2,7 ± 0,2 P = 0,89	середня
	Клітини <i>E. coli</i> з додаванням суспензії клітин <i>B. subtilis</i> після 40 хв. інкубування	78,9 ± 5,5 P = 0,42	3,1 ± 0,4 P = 0,36	середня

Все це дає можливість припустити, що комплексний препарат — пробіотик, створений на основі досліджуваних штамів бактерій, буде мати більш виражений ефект, ніж кожен з препаратів зокрема. Вивчені нами властивості дозволять живим мікробним культурам, що складуть основу препарату, проявляти активність в різних відділах ШКТ, не перешкоджаючи його заселенню нормальною мікробіотою і подавляючи при цьому патогенні мікроорганізми, здатні викликати дисбіоз ШКТ.

Висновки

1. Штами *B. subtilis* УКМ В 5007 та *E. coli* М 17 проявляють високий рівень антагоністичної активності в асоціативній культурі у співвідношенні 1: 1, яка у 73 % випадків значно перевищувала активність окремих культур по відношенню до умовно-патогенних мікроорганізмів.
2. Штам *B. subtilis* УКМВ 5007 характеризувався низьким рівнем адгезивної активності, штам *E. coli* М 17 та асоціативна культура, створена з цих штамів, характеризувались середнім рівнем адгезивної активності.

Література

1. Далін М. В., Фиш Н. Г. Адгезины микроорганизмов // Итоги науки и техники. — 1985. — Т. 16, № 8. — С. 84—103.
2. Перетц Л. Г. Значение нормальной микрофлоры для организма человека. — М.: Медицина, 1955. — 435 с.
3. Gibson G. R., Fuller R. Aspects of In Vitro and In Vivo research approaches directed toward identifying probiotic and prebiotic for human use // J. of nutrition. — 2000. — Vol. 130(2S suppl.). — P. 391—395.
4. Осипова И. Г. Некоторые аспекты механизма защитного действия колибактерина и споровых эубиотиков и новые методы их контроля: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1997. — 25 с.
5. А. с. 1722502А1 СССР, МКИ А61К39174. Препарат биоспорин для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний / Смирнов В. В., Резник С. Р., Сорокулова И. Б. и др. — Оpubл. 30.03.92. Биол. № 12.
6. Егоров Н. С. Выделение микробов — антагонистов и биологические методы учета их антибиотической активности. — М.: МГУ, 1956. — 78 с.
7. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 198 с.
8. Бриллис В. И., Брилене Т. А., Ленцнер Х. П., Ленцнер А. А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. — 1986. — № 4. — С. 210—212.
9. Johnson J. R., Skubitz K. M., Nowicki B. J., Jacques-Palaz K., Rakita R. M. Nonlethal adherence to human neutrophils mediated by Dr antigen-specific adhesins of *Escherichia coli* // Infect. And Immun. — 1995. — Vol. 63 (1). — P. 309—316.
10. Sokurenko E. V., Courtney H. S., Maslow J., Siitonen A., Hasty D. L. Quantitative difference in adhesiveness of type 1 fimbriated *E. coli* due to structural difference in fim H genes // J. bacteriology. — 1995. — Vol. 177(13). — P. 3680—3686.
11. Онищенко А. М., Гаврилко Л. О., Коробкова К. С., Сорокулова И. Б., Скрипаль І. Г. Моносахаридний склад глікокаліксу деяких молекутів і філогенетично близьких їм бактерій роду *Bacillus* // Мікробіол. журнал. — 1999. — Т. 61, № 5. — С. 10—18.

И. Г. Царукьянова, И. Б. Сорокулова, А. И. Осадчая, Н. А. Елинская
Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
Шампанский пер., 2, Одесса, 65058, Украина

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ И АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ

Резюме

В результате проведенной работы установлено наиболее оптимальное для проявления антагонизма к тест-культурам патогенных и условно патогенных микроорганизмов соотношение исследуемых бактерий в смешанной культуре -1:1. Установлено, что для штамма *B. subtilis* УКМ В-5007 характерна низкая, а для *E. coli* М 17 средняя степень адгезии к эритроцитам крови человека. При создании ассоциативной культуры, как и при изменении условий культивирования степень адгезии обоих штаммов существенно не изменяется.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* УКМ В-5007, *Escherichia coli* М 17, адгезия, антагонистическая активность.

I. G. Tsarukyanova, I. B. Sorokulova, A. I. Osadchaya, N. A. Elinskaya
Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Acad. Zabolotny St., 154, Kyiv, 03143, Ukraine

Mechnikov Odessa National University,
Department of Microbiology and Virusology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

ANTAGONISTIC AND ADHESIVE PROPERTIES OF PROBIOTIC STAMS OF BACTERIA

Summary

As a result of conducted work it has been selected the most optimum for antagonism to test-cultures of pathogenic and opportunistic microorganisms ratio of studied bacteria-1:1. It has been established, that *B. subtilis* УКМ В-5007 has a low and *E. coli* М 17 an average adhesion levels to human blood platelets. It was confirmed that creation of a mixed bacteria culture and modifications in cultivation conditions do not change strain adhesive properties.

Keywords: *Bacillus subtilis* УКМ В-5007-5007, *Escherichia coli* М 17, adhesion, antagonistic activity.