

## ОСОБЕННОСТИ МЕЖМИКРОБНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS SP.* И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Платонова Полина Викторовна  
ГАОУ «Губернаторский многопрофильный лицей-интернат для одаренных детей Оренбуржья», г. Оренбурга  
[jeanhong@mail.ru](mailto:jeanhong@mail.ru)

**Аннотация.** Изучены межмикробные взаимодействия бактерий рода *Lactobacillus sp.*, выделенных из пробиотика Лактоферон и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при патологии мочеполовой системы у кошек. Отмечена максимальная антагонистическая активность пробиотических *Lactobacillus sp.* в отношении *S.aureus*. Установлено, что пробиотические бактерии разнонаправленно влияют на антилизозимную активность (АЛА) и способность к биопленкообразованию (БПО) клинических изолятов микроорганизмов. В свою очередь, условно-патогенные микроорганизмы не вызывают достоверного изменения АЛА и БПО *L. acidophilus*.

**Ключевые слова:** *Lactobacillus*, *E. coli*, *S.aureus*, биоплёнки, антилизозимная активность, антагонизм, пробиотики.

Polina Platonova (Russia)

## FEATURES OF INTERMICROBIAL INTERACTIONS PROBIOTIC LACTOBACILLUS SP. AND OF OPTIONALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS

**Annotation.** The intermicrobial interactions of bacteria of the genus *Lactobacillus sp.* isolated from the probiotic Lactoferon and opportunistic microorganisms isolated from the pathology of the genitourinary system in cats were studied. The maximum antagonistic activity of probiotic *Lactobacillus sp.* with respect to *S. aureus*. It has been established that probiotic bacteria have a multidirectional effect on the antilysozyme activity (ALA) and the ability to biofilm formation (BFO) of clinical isolates of microorganisms. In turn, opportunistic pathogens do not cause significant changes in ALA and BFO *L. acidophilus*.

**Keywords:** *Lactobacillus*; *E. coli*; *S. aureus*; biofilms; anti-lysozyme activity; antagonism; probiotics.

## ВВЕДЕНИЕ

Пробиотики - это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через стабилизацию и оптимизацию функции его нормальной микрофлоры [1].

Пробиотик Лактоферон представляет собой комплекс лиофильно высушенных культур пробиотических бифидобактерий, лактобактерий, стрептококков, фитокомплекс экстрактов растений и вспомогательные компоненты. Препарат повышает иммунитет и резистентность организма, обеспечивает заселение кишечного тракта нормальной микрофлорой, препятствуя развитию гнилостных, условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов. Способствуют восстановлению нормального микробиоценоза кожи и открытых полостей, в том числе мочеполовой системы.

В настоящий момент накоплен большой фактический материал по эффективности использования пробиотиков в борьбе инфекционными и неинфекционными заболеваниями [3, 8, 9, 11], коррекции дисбиотических состояний [13], повышении продуктивности сельскохозяйственных животных [4, 6, 12, 14], изучены многие биологические свойства [10] и раскрыты механизмы антагонистической активности бактерий рода *Lactobacillus sp.* [5, 15] в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Однако практически отсутствуют данные по влиянию бактерии рода *Lactobacillus sp.* на персистентный потенциал и биопленкообразование условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при патологии мочеполовой системы у кошек.

Изучение межмикробных взаимодействий в настоящий момент приобретает все большее значение, так как в микробных ассоциациях между разными видами микроорганизмов эти взаимодействия сложны и неоднозначны.

Таким образом, **цель работы** - изучение межмикробных взаимодействий пробиотических *Lactobacillus sp.* и условно-патогенных бактерий, выделенных при патологии мочеполовой системы у кошек.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. Выделить из ветеринарного пробиотика Лактоферон бактерии рода *Lactobacillus sp.* и идентифицировать.
2. Изучить антагонистическую активность пробиотических лактобацилл.
3. Изучить изменчивость факторов персистенции и способности формировать биопленки пробиотических бактерий рода *Lactobacillus sp.* и условно-патогенных микроорганизмов после сокультивирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили 12 штаммов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (*E. coli* и *S. aureus* по 6 штаммов каждого вида), предоставленных лабораторией симбиоза и персистенции микроорганизмов ИКВС УрО РАН, и пробиотический штамм бактерий рода *Lactobacillus* sp., выделенный из препарата Лактоферон.

Для выделения чистых культур *Lactobacillus* sp. навеску пробиотика массой 1 г растворяли в 9 мл физиологического раствора. Затем суспензию в объеме 0,1 мл высевали на MRS-агар. Посевы инкубировали 48 часов при 37°C в микроаэрофильных условиях. Определяли принадлежность выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы. Определение ферментации углеводов проводили с использованием углеводов и бульона с 0,3% бромкрезолового зелёного.

Антагонистическую активность пробиотических штаммов лактобацилл изучали модифицированным вариантом чашечного метода по принципу отсроченного антагонизма и методом прямого антагонизма. Готовили взвесь суточных агаровых культур условно-патогенных микроорганизмов и лактобацилл. По 0,05 мл взвеси условно-патогенных микроорганизмов вносили в 5 мл жидкой питательной среды и добавляли 0,05 мл взвеси лактобацилл. Контролем роста служили пробы, в которые помещали лактобациллы и УПМ отдельно. Инкубацию проводили при 37°C<sup>0</sup> в микроаэрофильных условиях в течение 24 часов. Затем высевали полученные культуры в объеме 0,01 мл на MRS-агар, агар Эндо и ЖСА. Посевы инкубировали при 37°C<sup>0</sup> 24 часа, и затем учитывали результат.

Для изучения антилизоцимной активности (АЛА) микроорганизмов использовали фотометрический метод, предложенный О.В. Бухариным с соавт. (1999) [2].

Образование биоплёнок оценивали по степени связывания микроорганизмами кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах [16]. Уровень активности рассчитывали как отношение  $A_{540}$  опыт/ $A_{540}$ контроль, положительным считали значения более 1,1.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с определением средней арифметической величины, средней ошибки средней арифметической [7]. Различия считали достоверными при уровне вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

При определении общей численности микроорганизмов в 1 г препаратов были получены следующие результаты. Численность пробиотических лактобацилл в 1 г препарата Лактоферон составила  $10^5$  КОЕ/г, что соответствовало заявленному в инструкции к препарату.

Выделенные на среде MRS бактерии образовывали мелкие, гладкие, слегка выпуклые, белые колонии (Приложение 1). Выделенные микроорганизмы являлись неподвижными, грамположительными, неспоро-образующими, каталазонегативными палочками. Таким образом, на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств, выделенные штаммы бактерий были отнесены нами к роду *Lactobacillus sp.*. При оценке ферментации сахаров было выявлено, что штамм, выделенный из пробиотика Лактоферон относится к виду *L. acidophilus*.

При изучении антагонистической активности пробиотического штамма лактобацилл в отношении условно-патогенных микроорганизмов методом отсроченного антагонизма не выявлено зон задержки роста ни у одного из изучаемых штаммов *E.coli* и 33,3 % штаммов *S.aureus*. Среди стафилококков 66,7 % штаммов были чувствительны к метаболитам лактобацилл. Диаметр зон задержки роста был отмечен в пределах от  $24 \pm 1$  мм до  $44 \pm 1,5$  м, со средним значением  $33,75 \pm 1,5$  мм.

При изучении антагонистической активности методом прямого антагонизма было выявлено, что подавляющее большинство исследуемых штаммов были чувствительны к метаболитам пробиотического штамма. Так подавлялся рост 83,3% штаммов кишечных палочек в среднем на 18,8% и 100% штаммов золотистых стафилококков на 26,4%.

Так оптическая плотность бульонных культур *E.coli* после сокультивирования с пробиотическим штаммом лактобактерий в среднем снижалась с  $1,22 \pm 0,06$  до  $0,99 \pm 0,1$  ОП, а у *S.aureus* – с  $1,21 \pm 0,08$  до  $0,89 \pm 0,15$  ОП (Приложение 2).

На следующем этапе исследования приступили к изучению изменчивости

факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов и пробиотического штамма *L. acidophilus* после сокультивирования. Все исследуемые штаммы бактерий обладали антилизосимной активностью. Так АЛА *E. coli* составила  $0,22 \pm 0,061$  мкг/мл\*ОП, а у *S.aureus* -  $0,436 \pm 0,017$  мкг/мл\*ОП, *L. acidophilus* проявил высокий уровень АЛА  $1,89 \pm 0,323$  мкг/мл\*ОП. При изучении влияния пробиотического штамма бактерий рода *Lactobacillus* на антилизосимную активность условно-патогенных микроорганизмов было выявлено разнонаправленное влияние (Приложение 3). Так у *E. coli* наблюдалось увеличение выраженности способности к инаktivации лизосима в 2,9 раза ( $0,64 \pm 0,041$  мкг/мл\*ОП), а у *S.aureus* достоверного изменения АЛА не отмечалось ( $0,407 \pm 0,035$  мкг/мл\*ОП). В свою очередь, условно-патогенные микроорганизмы не вызывали достоверного изменения АЛА *L. acidophilus* препарата Лактоферон.

Исследуемые штаммы микроорганизмов обладали способностью формировать биопленки, при этом максимальная выраженность БПО отмечена у *S.aureus*  $1,9 \pm 0,09$  у.е., у *L. acidophilus* составила -  $1,5 \pm 0,23$  у.е., а у *E. coli* -  $1,19 \pm 0,084$  у.е. (Приложение 4).

В результате проведенного эксперимента выявлено, что *L. acidophilus* неоднозначно влияют на способность условно-патогенных микроорганизмов формировать биопленки. Лактобактерии достоверно не изменяли способность *E. coli* к биопленкообразованию ( $1,21 \pm 0,068$  у.е.), а у *S.aureus* стимулировали биопленкообразование, увеличивая коэффициент в 1,7 раза ( $3,22 \pm 0,143$  у.е.) (Приложение 5). *E. coli* вызывала усиление способности к биопленкообразованию у *L. acidophilus* в 1,6 раза ( $2,39 \pm 0,134$  у.е.), а *S.aureus* достоверно не изменяли коэффициент БПО лактобактерий ( $1,49 \pm 0,120$  у.е.) (Приложение 6).

Таким образом, характер, механизмы и результаты взаимодействия бактерий рода *Lactobacillus* и условно-патогенных микроорганизмов сложны и неоднозначны, и требуют дальнейшего изучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Из ветеринарного пробиотика Лактоферон выделен штамм *L. acidophilus*, характеризующийся антагонистической активностью, способностью формировать биопленки и высокой АЛА.
2. Максимальная антагонистическая активность пробиотических *Lactobacillus sp.* отмечена в отношении *S.aureus*.
3. Установлено, что пробиотические бактерии разнонаправленно влияют на свойства УПМ, так у *E. coli* наблюдалось увеличение АЛА, а способность к БПО не изменялась, у *S.aureus* достоверного изменения АЛА не отмечалось, но было выявлено стимулирование биопленкообразования. В свою очередь, условно-патогенные микроорганизмы не вызывали достоверного изменения АЛА *L. acidophilus*, но *E. coli* стимулировала способность к биопленкообразованию, а *S.aureus* достоверно не изменял ее.

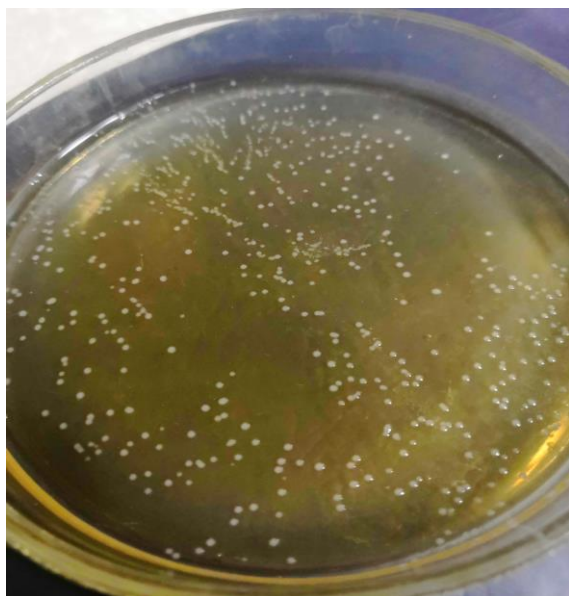
## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК



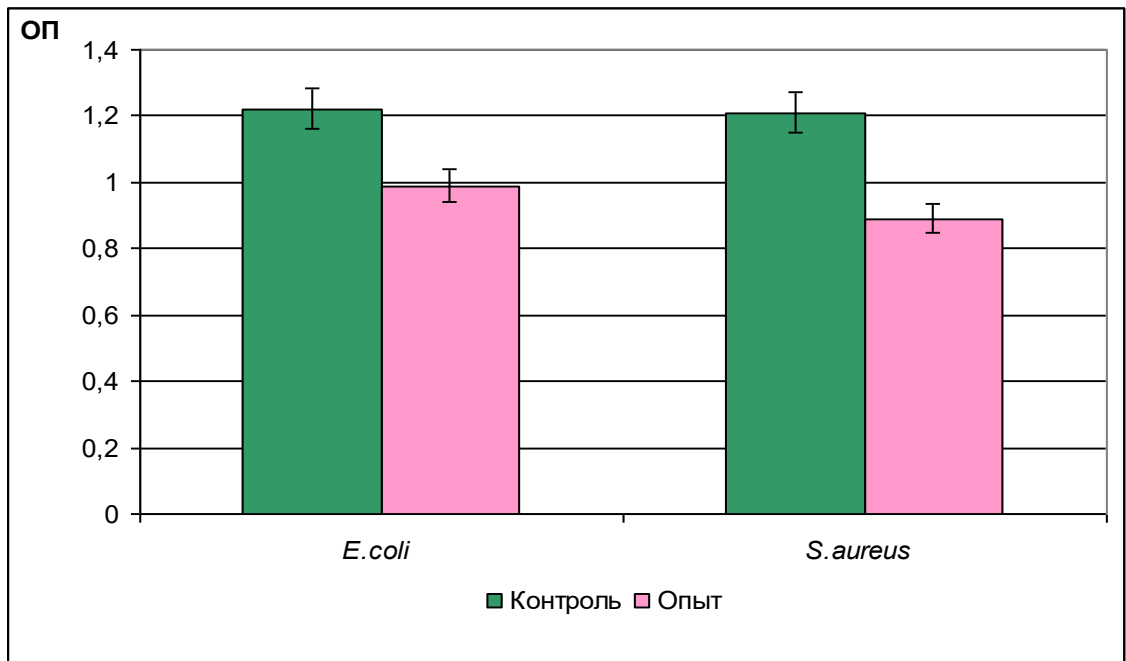
1. Бондаренко В.М., Чуприна Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов. // БИОпрепараты. 2003. №3.С.2-5.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина: Екатеринбург: УрО РАН, 1999: 365 с.
3. Гаврилова Е. А. Динамика гуморальных факторов неспецифической защиты организма коз на фоне применения лактоамиловорина. // Матер. Международного симпозиума «Современные проблемы ветеринарной диетологии». СПб, 2008: 144-145.
4. Данилевская Н.В., Субботин В.В., Вашурин О.А. Фармакостимуляция продуктивности дойных коров пробиотическим препаратом Лактобифадол. // Ветеринария. 2003. №2.
5. Ермоленко Е.И., Суворов А.Н., Воейкова А.В. Определение антагонистической активности лактобактерий. // Материалы X Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов. Белгород. 2006. С. 25 – 26.
6. Клычкова М.В. Влияние пробиотика лактоамиловарина на рост и развитие утят-бройлеров. // Известия ОГАУ. 2004. № 3. С 151-152.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.Высшая школа, 1990. 352 с.
8. Малик, Н.И. Пробиотики в лечении молодняка. // Животноводство. 2000. № 3. С. 21-24.
9. Малик Е.В. Пробиотики в профилактике желудочно-кишечных болезней свиней. // Главный зоотехник. 2007. №11. С. 48-51.
10. Новик Г.И., Астапович Н.И., Кюблер Й. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков. // Материалы X Международной научно-практической конференции молодых учёных и специалистов. Белгород, 2006 г. С. 29.
11. Овод А.С. Профилактика диарей новорожденных телят пробиотиками. // Ветеринария. 2007. № 2. С 6 -7.

12. Панин А.Н., Малик Н.И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных. // Ветеринария. 2006. № 7. С 19.
13. Сидоров М.А., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Нормальная микрофлора животных и её коррекция пробиотиками. // Ветеринария. 2000. № 11. С. 17-22.
14. Тараканов Б.В., Николичева Т.В., Никулин В.Н. Влияние микроцикла на микрофлору кишечника и продуктивность цыплят бройлеров. // Ветеринария. 2007. № 9. С. 47–50.
15. Тараканов Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных. // Ветеринария. 2000. № 1. С. 47-54.
16. O'Toole G., Kaplan H.B. Kolter R. Biofilm formationas microbial development. // Annu Rev Microbiol. 2000. №54. P. 49-79.

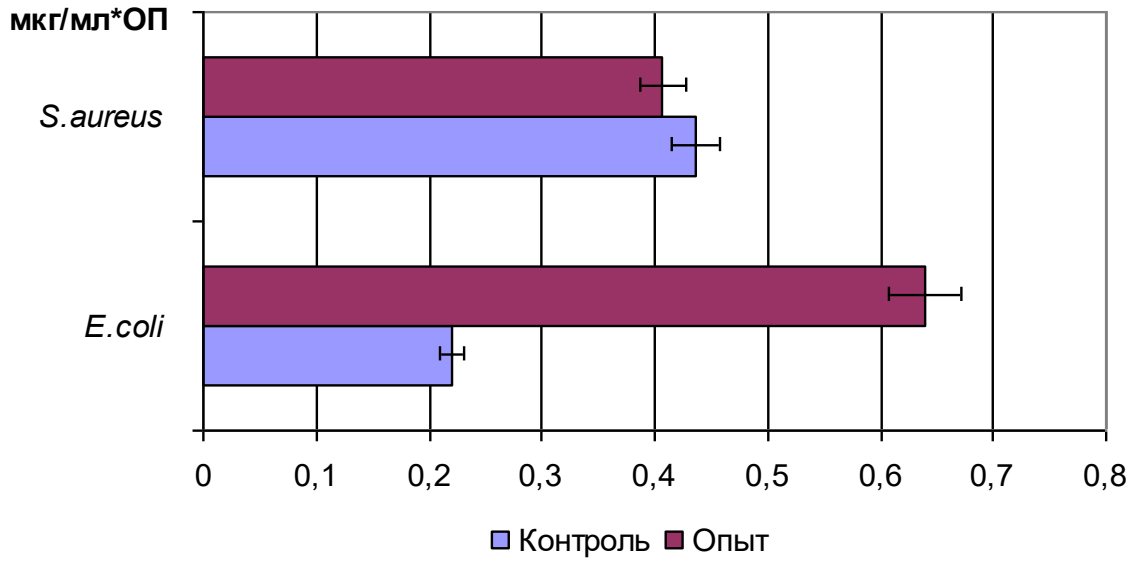
Морфология колоний *Lactobacillus* sp.



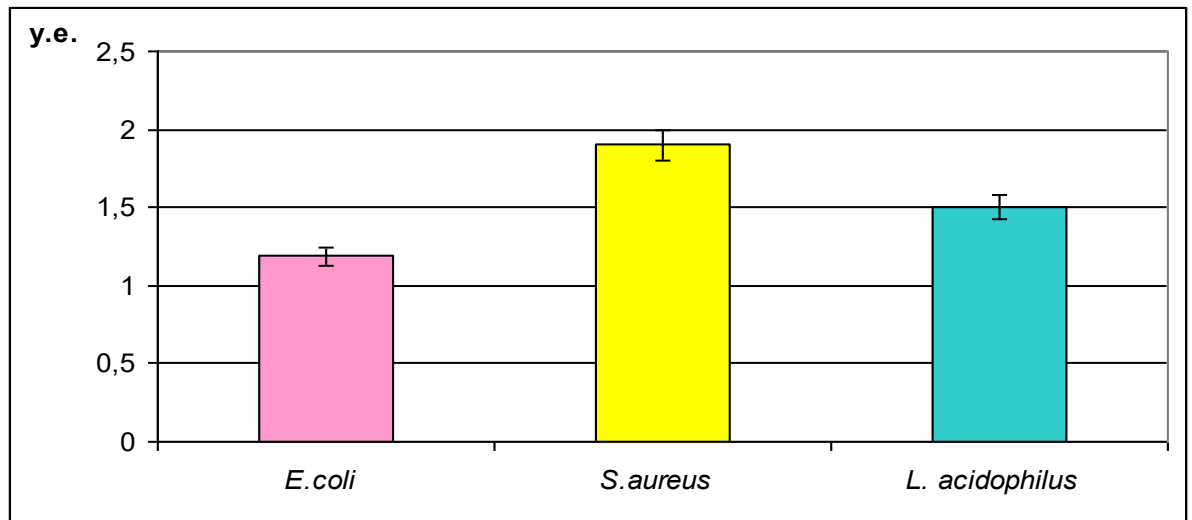
Влияние *L. acidophilus* на рост бульонных культур УПМ



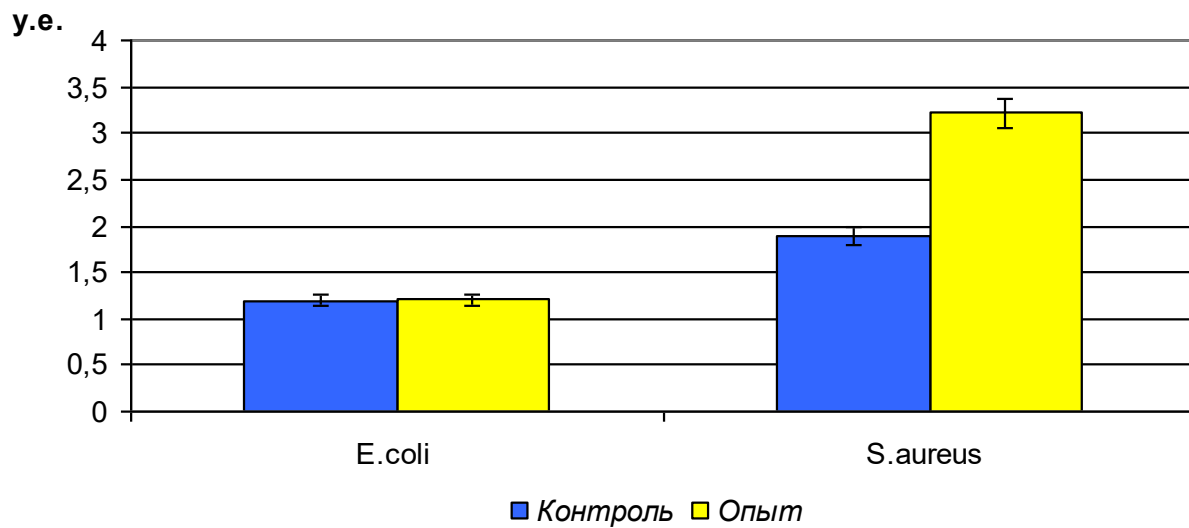
Влияние *L. acidophilus* на антилизоцимную активность бульонных культур условно-патогенных микроорганизмов



## Коэффициент БПО исследуемых микроорганизмов



Влияние *L. acidophilus* на способность к биопленкообразованию  
бульонных культур условно-патогенных микроорганизмов



Влияние условно-патогенных микроорганизмов на способность  
*L. acidophilus* к биопленкообразованию

