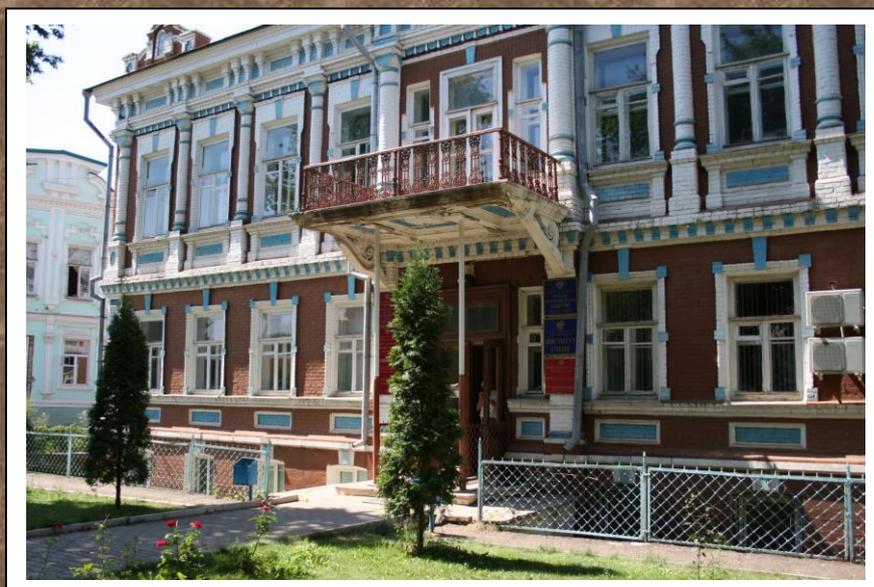


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2012 * № 2

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2012

УДК 579.61

О.А. Капустина¹, А.Ю. Гаранкина², О.Л. Карташова¹, Н.С. Пашинин²

ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS SP., ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРОБИОТИКОВ

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

Цель. Изучить взаимное влияние на персистентный потенциал бактерий рода *Lactobacillus sp.*, входящих в состав ветеринарных пробиотиков, и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при дисбиозе кишечника у животных.

Материалы и методы. 24 штамма условно-патогенных микроорганизмов: лактозонегативные гемолитические *E. coli*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *Candida albicans*, выделенные из кишечника животных при дисбиозе. Выделенные из ветеринарных пробиотиков Лактоферон *L. acidophilus*, Лактоамиловорин *L. amylovorus* и Лактобифадол *L. acidophilus*. Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Факторы персистенции (АЛА, АЛФА) изучали фотонейлометрическим и иммуноферментным методами до и после совместного культивирования в жидкой питательной среде.

Результаты. Установлено, что лактобациллы, выделенные из пробиотиков, по-разному влияют на персистентные признаки условно-патогенной микрофлоры. При этом наиболее эффективным среди отобранных пробиотиков оказался Лактоамиловорин, снижающий АЛФА и АЛА у большинства изученных видов микроорганизмов. В свою очередь, условно-патогенные микроорганизмы разнонаправленно влияют (снижение, повышение, индифферентный эффект) на АЛФА и достоверно не изменяют АЛА лактобацилл, незначительно повышая способность к инактивации лактоферрина у *L. amylovorus*.

Заключение. Полученные данные могут быть использованы в ветеринарии для коррекции дисбиотических нарушений у животных с использованием наиболее эффективных пробиотиков, отобранных под контролем персистентных характеристик.

Ключевые слова: пробиотики, условно-патогенные микроорганизмы, бактерии рода *Lactobacillus sp.*, факторы персистенции, межмикробные взаимодействия

О.А. Kapustina¹, A. Y. Garankina², O.L. Kartashova¹, N.S. Pashinin²

MUTUAL INFLUENCE OPPORTUNISTIC PATHOGENS AND LACTOBACILLUS SP., ISOLATED OF THE VETERINARY PROBIOTICS, ON THE PERSISTENT POTENTIAL

¹ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg, Russia

² State Agrarian University, Orenburg, Russia

Aim. Define the mutual influence of *Lactobacillus sp.*, isolated of the veterinary probiotics, and opportunistic microorganisms, isolated by animals with intestinal dysbiosis, on the persistent potential.

Materials and methods. 24 strains of opportunistic microorganisms: lactosonegative hemolytic *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, isolated from the intestines of animals with dysbiosis. Laktoferon (*L. acidophilus*), Laktoamilovorin (*L. amylovorus*), Laktobifadol (*L. acidophilus*) isolated from veterinary probiotics. Isolation and identification of microorganisms were carried out by common methods based on morphological, tinctorial, cultural and biochemical properties. Factors of persistence (ALA, ALfA) were studied by foto-nefelometric and enzyme immunoassays methods before and after mutual influence of microorganisms in a liquid medium.

Results. *Lactobacillus sp.*, isolated from probiotics, have different effects on the persistent signs of opportunistic microorganisms. The most effective among all selected probiotics were Laktoamilovorin, reducing the ALfA and the ALA in most species studied microorganisms. Whereas the opportunistic microorganisms differently affect (reduce, increase, indifferent effect) on the ALfA and do not significantly change the ALA of *Lactobacillus sp.*, slightly increasing the ALfA of *L. amylovorus*.

Conclusion. The data obtained can be used in veterinary medicine to correct dysbiotic disorders in animals with the most effective probiotics, selected under the control of persistent characteristics.

Key words: probiotics, opportunistic microorganisms, *Lactobacillus sp.*, factors of persistence

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 оптимизацию и стабилизацию его микробиоты. Использование пробиотиков является одним из самых эффективных и физиологичных путей профилактики и коррекции нарушения микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, а также развивающегося вследствие этого ряда вторичных расстройств не только пищеварительной, но и иммунной и эндокринной систем [6, 14].

Среди многочисленных пробиотиков особый интерес представляют пробиотики из живых культур бактерий рода *Lactobacillus sp.* Полная безвредность и безопасность используемых для изготовления пробиотиков апатогенных штаммов лактобацилл при высокой антагонистической и биологической активности явились основанием для их широкого изучения в качестве профилактических и лечебных препаратов при многих патологических процессах у человека и животных. На основе бактерий рода *Lactobacillus sp.* в России производят такие пробиотики для животных как Лактоамиловорин, Лактобифадол, Лактоферон, Лактомикроцикол и др.

В настоящий момент выявлена высокая эффективность применения пробиотиков «АВИЛАКТ-1К» и Лактобактерина при выращивании цыплят-бройлеров [13] и препаратов Лактомикроцикол, Микроцикол и Лактоамилово-

рин при стимулировании факторов неспецифической резистентности молодняка гусей и повышение их продуктивности [5], так же изучено влияние препаратов йода и Лактоамиловорина на естественную резистентность и продуктивность кур-несушек [21], доказано, что применение пробиотика Лактобифид, эффективно при терапии послеродовых эндометритов у КРС и способствует стабилизации естественного микробиоценоза кишечника [1, 19].

Таким образом, в настоящий момент накоплен большой фактический материал по эффективности использования пробиотиков в борьбе с инфекционными и неинфекционными заболеваниями [4, 11, 12, 15], коррекции дисбиотических состояний [17], повышении продуктивности сельскохозяйственных животных [7, 10, 18], изучены многие биологические свойства [14] и раскрыты механизмы антагонистической активности бактерий рода *Lactobacillus sp.* [9, 20] в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Вместе с тем, практически отсутствуют данные по взаимному влиянию на персистентный потенциал бактерий рода *Lactobacillus sp.*, входящих в состав ветеринарных пробиотиков, и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при дисбиозе кишечника у животных, что и явилось целью нашей работы.

Материалы и методы.

Материалом исследования послужили 24 штамма условно-патогенных микроорганизмов: лактозонегативные гемолитические *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, выделенные из кишечника животных, а также штаммы бактерий рода *Lactobacillus sp.*, выделенные из ветеринарных пробиотиков Лактоферон (*L. acidophilus*), Лактоамиловорин (*L. amylovorus*) и Лактобифадол (*L. acidophilus*).

Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств [16]. Факторы персистенции (АЛА, АЛФА) условно-патогенных микроорганизмов изучали фотонейлометрическим [2] и иммуноферментными методами [3] до и после совместного культивирования с бактериями рода *Lactobacillus* в жидкой питательной среде [8]. Статистическую обработку осуществляли с использованием параметрических методов. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты.

Полученные результаты показали, что все изученные штаммы условно-

патогенных микроорганизмов характеризовались способностью к инаktivации как лизоцима, так и лактоферрина. Максимальное значение АЛфА установлено у *E. coli* (2391 ± 368 нг/мл). У золотистых стафилококков среднее значение выраженности этого признака составляло 1908 ± 23 нг/мл, у *K. pneumoniae* – 1154 ± 23 нг/мл и *C. albicans* – 385 ± 54 нг/мл. Средние значения АЛА у штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *C. albicans* были равны $0,22 \pm 0,06$, $0,44 \pm 0,02$, $0,65 \pm 0,08$ и $0,68 \pm 0,05$ мкг/мл соответственно.

При изучении влияния пробиотических штаммов бактерий рода *Lactobacillus* на персистентные свойства условно-патогенных микроорганизмов выявлено разнонаправленное воздействие на АЛА, снижение способности к инаktivации лактоферрина у всех изученных штаммов (рис.1), а также ингибирование роста стафилококков под воздействием *L. acidophilus*, выделенной из препарата Лактобифадол.

Так, антилактоферриновая активность *E. coli* и *S. aureus* после их сокультивирования со штаммом *L. amylovorum* снизилась до 0 нг/мл. Отмечено также снижение данного признака под воздействием *L. acidophilus* из препарата Лактоферон у *E. coli* на 92,4% от исходного уровня ($182,5 \pm 8,3$ нг/мл), у *S. aureus* на 96% ($75,0 \pm 4,7$ нг/мл), а из препарата Лактобифадол у *E. coli* на 97% ($67,7 \pm 6,8$ нг/мл). При этом грибы рода *Candida* достоверно не изменяли АЛфА под действием *L. amylovorum* ($371,7 \pm 49,4$ нг/мл), в то же время у них отмечено снижение данного признака при воздействии штамма *L. acidophilus* из препарата Лактобифадол на 92,7% ($28,0 \pm 4,5$ нг/мл) и штамма *L. acidophilus* из препарата Лактоферон на 60,8% ($151,7 \pm 22,8$ нг/мл). Максимальному снижению АЛфА у бактерий рода *Klebsiella* (до $8 \pm 0,68$ нг/мл) способствовало влияние на них штамма *L. acidophilus* из препарата Лактобифадол. Штамм *L. acidophilus* из препарата Лактоферон снижал признак на 78% ($250,0 \pm 9,7$ нг/мл), а *L. amylovorum* – на 92,8% ($85 \pm 7,43$ нг/мл).

Изучение влияния штаммов лактобацилл, выделенных из пробиотиков, на АЛА условно-патогенных микроорганизмов позволило установить, что все использованные в эксперименте лактобациллы стимулировали способность инаktivировать лизоцим у *E. coli*, при этом значение признака увеличивалось в ряду: Лактоамиловорин ($0,44 \pm 0,05$ мкг/мл), Лактоферон ($0,64 \pm 0,04$ мкг/мл), Лактобифадол ($0,69 \pm 0,08$ мкг/мл). *L. acidophilus* из препарата Лактоферон и Лактобифадол повышали также АЛА бактерий рода *Klebsiella*, увеличивая зна-

чение признака до $0,92 \pm 0,08$ мкг/мл и $0,84 \pm 0,06$ мкг/мл соответственно, тогда как *L. amylovorum* достоверного изменения способности к инактивации лизоцима у данных микроорганизмов не вызывал ($0,61 \pm 0,071$ мкг/мл).

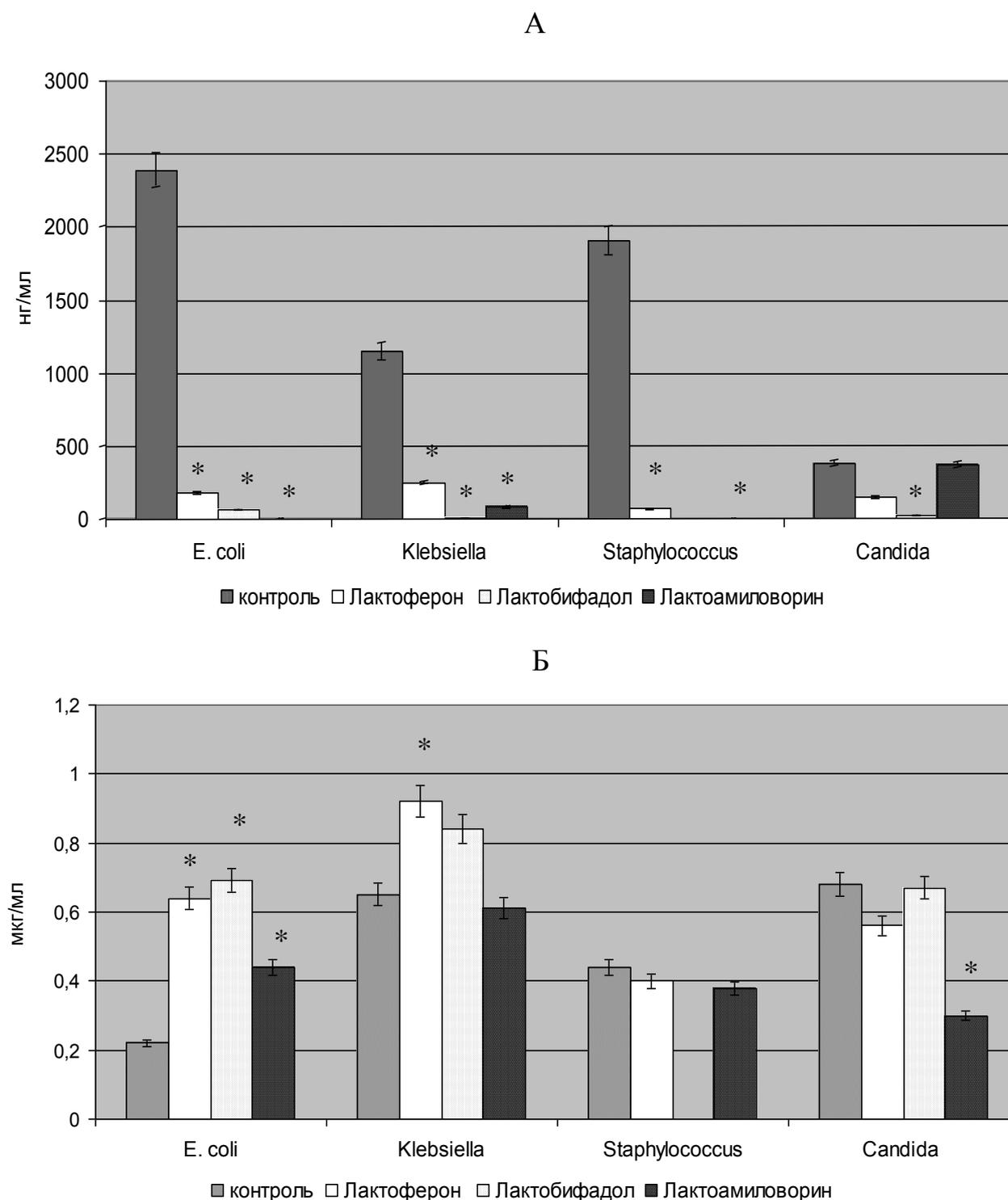


Рис.1. Влияние пробиотических штаммов лактобацилл на антилактоферриновую (А) и антилизоцимную (Б) активности условно-патогенных микроорганизмов (* - $p \leq 0,05$).

Существенно не изменялась и АЛА *S. aureus*: после воздействия штамма *L. acidophilus* из препарата Лактоферон и *L. amylovorum* из препарата Лактоамиловорин значения признака составляли $0,41 \pm 0,04$ мкг/мл и $0,38 \pm 0,09$ мкг/мл соответственно. Штамм *L. acidophilus* из препарата Лактобифадол достоверно не изменял антилизоцимную активность грибов рода *Candida* ($0,67 \pm 0,09$ мкг/мл), тогда как штамм *L. amylovorum* снижал признак на 57,1% ($0,3 \pm 0,03$ мкг/мл), а штамм *L. acidophilus* из препарата Лактоферон – на 14,3% ($0,56 \pm 0,05$ мкг/мл).

Далее нами было изучено влияние условно-патогенных микроорганизмов на персистентные свойства лактобацилл, выделенных из пробиотиков. Установлено разнонаправленное влияние условно-патогенных микроорганизмов на АЛФА пробиотических штаммов бактерий рода *Lactobacillus sp.* (рис. 2, а).

Так, антилактоферриновая активность *L. acidophilus* ($250,0 \pm 12,0$ нг/мл) из препарата Лактобифадол возрастала под влиянием грибов рода *Candida* до $346,7 \pm 37,6$ нг/мл, *S. aureus* до $400,0 \pm 48,7$ нг/мл, бактерий рода *Klebsiella* до $433,3 \pm 61,7$ нг/мл, *E. coli* достоверно не изменяли АЛФА лактобацилл ($246,7 \pm 66,7$ нг/мл). Способность *L. amylovorum* инактивировать лактоферрин также возрастала при воздействии бактерий рода *Klebsiella* и *S. aureus* до $410,0 \pm 25,17$ нг/мл и $411,7 \pm 21,7$ нг/мл соответственно, *E. coli* до $376,7 \pm 35,5$ нг/мл, грибов рода *Candida* до $293,0 \pm 36,6$ нг/мл. АЛФА у *L. acidophilus* из препарата Лактоферон повышали стафилококки (с $500,0 \pm 36,0$ лдо $600,0 \pm 25,4$ нг/мл), тогда как бактерии рода *Klebsiella*, грибы рода *Candida* и *E. coli* снижали способность этих лактобацилл к инаktivации лактоферрина – до $443,0 \pm 52,7$, $348,0 \pm 49,7$ и $300,0 \pm 58,5$ нг/мл соответственно ($p \leq 0,05$).

Все изученные штаммы лактобацилл обладали способностью к инаktivации лизоцима: *L. acidophilus* (Лактобифадол) – $1,9 \pm 0,2$ мкг/мл, *L. acidophilus* (Лактоферон) – $1,9 \pm 0,3$ мкг/мл, *L. amylovorum* – $1,9 \pm 0,3$ мкг/мл. Под влиянием условно-патогенных микроорганизмов АЛА *L. acidophilus* из препаратов Лактобифадол и Лактоферон достоверно не изменялась, тогда как *E. coli* достоверно снижала способность к инаktivации лизоцима у *L. amylovorum* ($1,3 \pm 0,1$ мкг/мл), а *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *C. albicans*, наоборот, незначительно повышали признак лактобацилл до $2,08 \pm 0,049$ мкг/мл (рис., 2, б).

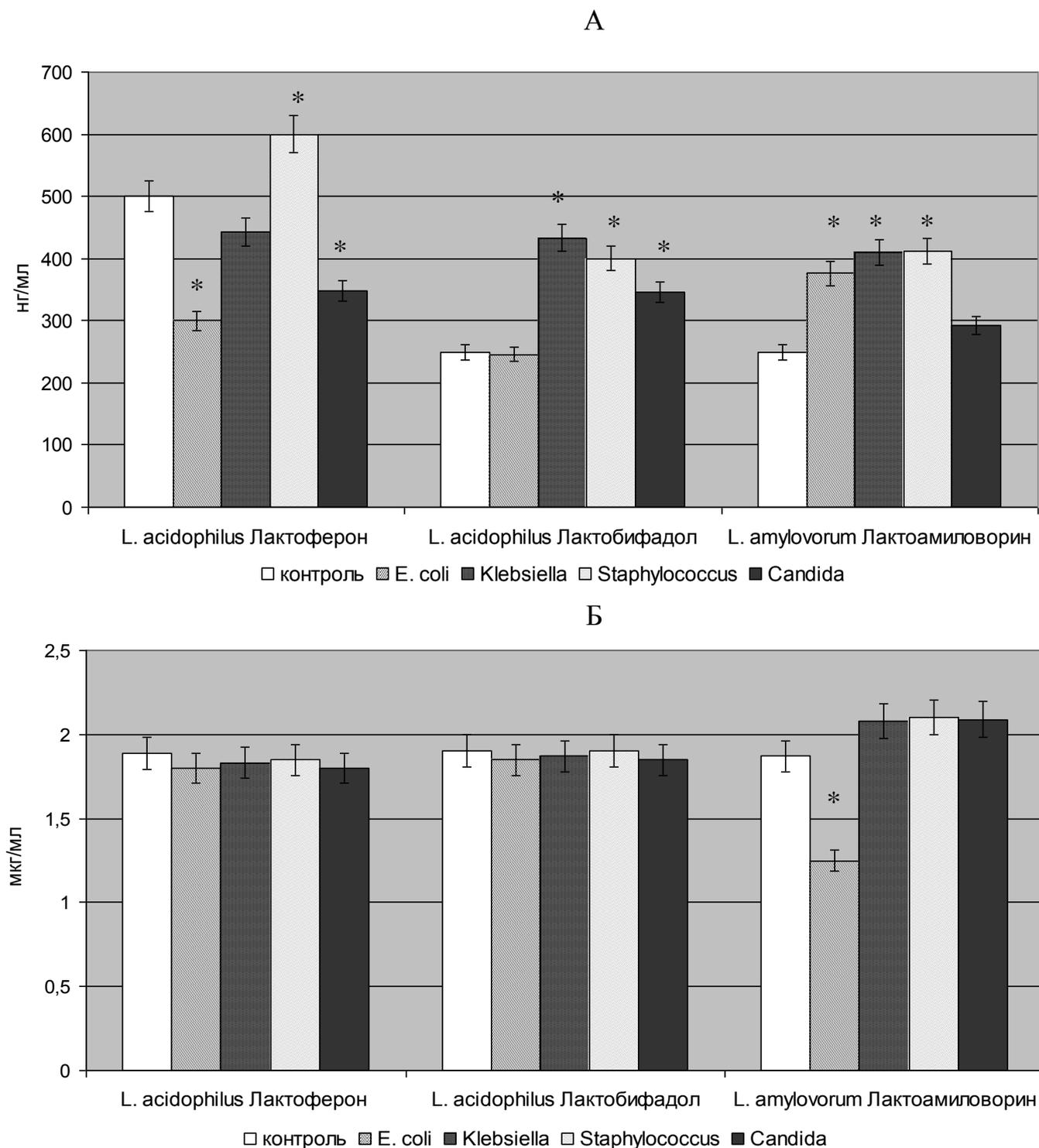


Рис. 2. Влияние условно-патогенных микроорганизмов на антилактоферриновую (А) и антилизоцимную (Б) активности пробиотических штаммов лактобацилл (* - $p \leq 0,05$).

Заключение.

С целью коррекции дисбиотических состояний в настоящее время используют пробиотики, содержащие микроорганизмы, оказывающие положительный корригирующий эффект на биоценоз, влияя на условно-патогенную флору. В практике широко используются биопрепараты, содержащие лактобациллы.

Являясь представителями аутохтонной микрофлоры, лактобациллы играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности разных биотопов тела за счёт конкурентного ингибирования адгезии и коаггрегирования аллохтонных микроорганизмов, продукции органических кислот, бактериоцинов, лизоцима, перекиси водорода, этанола и ряда других антагонистически активных веществ [22, 23].

В ходе исследования установлено, что лактобациллы из всех изученных пробиотиков обладают способностью к модификации персистентных свойств изученных условно-патогенных микроорганизмов. Они достоверно снижают АЛФА и разнонаправлено влияют на их АЛА.

С другой стороны, показано, что все пробиотические штаммы лактобацилл обладают такими факторами персистенции, как АЛФА и АЛА, существенно не отличаясь между собой по уровню их экспрессии (исключение составляет АЛФА у *L. acidophilus* из препарата Лактоферон). При этом условно-патогенные микроорганизмы также способны разнонаправлено влиять (снижение, повышение, индифферентный эффект) на персистентные свойства лактобацилл.

Полученные данные могут представлять интерес с точки зрения формирования колонизационного потенциала пробиотиков, поскольку известно, что штаммы микроорганизмов с высокими показателями персистентных признаков переживают в организме более длительное время [2].

Таким образом, установлено, что различные пробиотики по-разному влияют на персистентные признаки условно-патогенной микрофлоры, что необходимо учитывать при отборе штаммов лактобацилл для создания биопрепаратов. При этом наиболее эффективным среди выбранных биопрепаратов оказался Лактоамиловарин, снижающий АЛФА и АЛА у большинства изученных видов микроорганизмов. Полученные данные могут быть использованы в ветеринарии при коррекции дисбиотических нарушений с использованием эффективных пробиотиков, отобранных под контролем персистентных характеристик.

Литература.

1. Андреева А.В. Активизация Т- и В-систем иммунитета при эндометритах у коров прополисным молочком и пробиотиком Лактобифид в комплексе с этиопатогенетическими средствами терапии. Цитокины и воспаление. 2002. 2: 22.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина: Екатеринбург: УрО РАН, 1999. 365.
3. Вальшева, И.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 2005.
4. Гаврилова Е. А. Сравнительная оценка влияния лактоамиловорина и споробактерина на факторы естественной резистентности у интактных и больных коз. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Оренбург, 2009.
5. Герасименко В.В. Морфокинетическое действие микрофлоры желудочно-кишечного тракта на организм гусей. Вестник ОГУ. 2008. 2: 132-136.
6. Данилевская Н.В., Сидоров М.А., Субботин В.В. Пробиотики в ветеринарии. Ветеринария. 2002. 11. 6-12.
7. Данилевская Н.В., Субботин В.В., Вашурин О.А. Фармакостимуляция продуктивности дойных коров пробиотическим препаратом Лактобифадол. Ветеринария. 2003. 2. 50-55.
8. Ермоленко Е.И., Ждан-Пушкина С.Х., Суворов А.Н. Взаимодействие *C. albicans* и *Lactobacillus plantarum in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2004. 6: 49-54.
9. Ермоленко Е.И. Молочнокислые бактерии: индивидуальные особенности действия на патогенные микроорганизмы, макроорганизм и его микробиоту. Автореф. дис. докт. мед. наук. СПб., 2009.
10. Клычкова М.В. Влияние пробиотика лактоамиловарина на рост и развитие утят-бройлеров. Известия ОГАУ. 2004. 3: 151 – 152.
11. Малик Н.И. Пробиотики в лечении молодняка. Животноводство. 2000, 3: 21 - 24.
12. Малик Е.В. Пробиотики в профилактике желудочно-кишечных болезней свиней. Главный зоотехник. 2007. 11: 48 - 51.
13. Неминущая Л.А., Токарик Э.Ф., Воробьева Г.И. Эффективность нового синбиотического комплекса для птиц АВИЛАКТ ФОРТЕ. Птицеводство. 2010. 1: 45- 46.
14. Новик Г. И., Мелентьев Г.И., Самарцев А.А. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков. Микробиология. 2006. 2: 187-194.
15. Овод А.С. Профилактика диарей новорожденных телят пробиотиками. Ветеринария. 2007, 2: 6-7.
16. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах. Т.1. М.: Мир, 1997.
17. Сидоров М.А., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Нормальная микрофлора животных и её коррекция пробиотиками. Ветеринария. 2000. 11: 17 – 22.
18. Тараканов Б.В., Николичева Т.В., Никулин В.Н. Влияние микроцикола на микрофлору кишечника и продуктивность цыплят бройлеров. Ветеринария. 2007. 9: 47 – 50.
19. Тараканов Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных. Ветеринария. 2000. 1: 47-54.
20. Ширяева О.Ю. Влияние препаратов йода и лактоамиловорина на естественную резистентность и продуктивность кур-несушек. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Оренбург, 2007.
21. Piard J.C. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocin and other antibacterial substances. 1992. 4: 113-142.
22. Vanderbergh P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 1993. 12: 221-238.

Поступила 27.07.2012

(Контактная информация: **Карташова Ольга Львовна** - д.б.н., заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; E-mail: labpersist@mail.ru)