

СПЕКТР АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ К ЭНТЕРОКОККАМ *ENTEROCOCCUS FAECIUM*, *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Огай Дарья Кисеновна, Миралимова Шахло Мирджамаловна, Кутлиева Гузаль Джуманиязовна
Элова Нилюфар Арашовна, Сахибназарова Хонсулув Абдувахобовна
Институт микробиологии АН РУз
Institute Microbiology of the Uzbek Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan
E-mail: aziz0761@gmail.com

ABSTRACT

The spectrum of antimicrobial and bacteriocinogenic action of 5 strains of *Lactobacilli* to 14 strains of enterococci was studied. It was found that the antimicrobial activity of lactobacilli against enterococci *E. faecium* and *E. faecalis* depends on the species and strain belonging of both lactobacilli and enterococci. Comparison of two species of enterococci showed that enterococci *E. faecalis* are more sensitive than *E. faecium*. Isolated strain *L. plantarum* 42 from highly salted cabbage, showing antimicrobial and bacteriocinogenic effect on enterococci.

Keywords: enterococcus, colonization, bacteriocin, plantaricin, peptides, bacteriocinogenic activity

РЕЗЮМЕ

Изучен спектр антимикробного и бактериоциногенного действия 5 штаммов лактобактерий к 14 штаммам энтерококков. Выявлено, что антимикробная активность лактобацилл к энтерококкам *E. faecium* и *E. faecalis* зависит от видовой и штаммовой принадлежности как лактобацилл, так и энтерококков. Сравнение двух видов энтерококков показало, что энтерококки *E. faecalis* более чувствительны, чем *E. faecium*. Выделен штамм *L. plantarum* 42 из сильно засоленной капусты, проявляющий антимикробное и бактериоциногенное действие на энтерококки.

Ключевые слова: энтерококк, колонизация, бактериоцин, плантарицин, пептиды, бактериоциногенная активность

ВВЕДЕНИЕ

Спектр оппортунистических инфекций чрезвычайно широк и включает бактерии, вирусы, грибы, простейшие. На современном этапе основные возбудители бактериальных оппортунистических инфекций - это условно-патогенные энтеробактерии и стафилококки, а также их ассоциации.

Данные литературы показывают, что в очагах воспалительных заболеваний кишечника наиболее часто встречаются именно энтерококки. *Enterococcus faecalis* участвует в инициации воспалительных заболеваний человека при генетической чувствительности и дисрегуляции иммунного ответа. Показана роль энтерококков и как возбудителей инфекционных послеоперационных осложнений (Габриэлян И.Н., Горская Е.М., 2007).

Выделен местный штамм *Lactobacillus plantarum* 42, обладающий антимикробной и бактериоциногенной активностью к энтерококкам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. В природе крайне редко встречаются лактобациллы-продуценты особых бактериоциноподобных веществ, которые активно подавляют рост и развитие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Тем не менее известно, что лактобацилла *Lactobacillus plantarum* образует такие бактериоцины как, плантарицин S (Sarah et al 1988), плантарицин C11 (Daeschell et al, 1990), плантарицин A (Chin Hwa Sup et al, 2001) TF711 (Hernandez et al, 2005). Указанные плантарицины ингибируют рост не только грамположительных бактерий (*Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*), грамотрицательных – *Salmonella taphi*, *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*. Из индикаторных культур слабо изучено антимикробное действие лактобацилл на рост и развитие энтерококков. Лишь в последнее десятилетие стали уделять внимание энтерококкам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, особенно фекальному энтерококку, который относится к комменсальным бактериям (к нормофлоре кишечника) и не проявляет патогенных свойств при нормальной функции иммунной системы человека. Однако, при генетической чувствительности организма человека и дисрегуляции иммунной системы участвует в инициации воспалительных заболеваний кишечника. Так, на мышах дефицитных по интерлейкину 10 и моноассоциированных с *Enterococcus faecalis* показано, что через 10-12 недель после колонизации бактериями развивается дистальный колит толстого кишечника, который далее прогрессирует до воспаления дуоденума, в течение более длительного времени, чем дистальный колит, более чем через 30 недель (Kim S.C., 2005).

Целью данной работы является изучение антимикробной и бактериоциногенной активности местных штаммов рода *Lactobacillus* к энтерококкам *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты: Испытуемые культуры *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 (типовой штамм), местные штаммы *Lactobacillus plantarum* 42, 44, *L. rhamnosus* 41, *L. casei* subsp *paracasei* 48. Индикаторные культуры: *Enterococcus faecalis* OGIFR 1, *Enterococcus faecium* 2897, K50 M76, 4605, 1026; *E. faecalis* 2714, FI 2-2, 4610, из коллекции музейных культур Всероссийского Института генетики промышленных микроорганизмов (ВКМП) и местные штаммы *E. faecium* 364, 302, *E. faecalis* 422, 345 из коллекции культур лаборатории генетики молочнокислых бактерий Института микробиологии АН РУз. Восстановили лиофилизированных во флаконе испытуемых штаммов лактобацилл проводили в MPC-бульоне (Hi-Media) и индикаторных культур энтерококков в общепринятом гидролизатно-молочном бульоне (ГМ), по общепринятой методике. Получали мягкий гидролизованный агар добавляя 0,75% агара в ГМ-бульон, твёрдый MPC-агар добавляя 1,8% сухого агара в MPC-бульон. Для изучения антимикробной активности лактобацилл, их выращивали в MPC-бульоне при (37±1)°C

в анаэробе в атмосфере азота 48 часов при той же температуре в термостате. Жидкую культуру лактобацилл в количестве 1-3 мкл капали на поверхность агаризованной среды, выращивали в анаэробе при (37±1)°С 12 часов, проводили индукции бактериоцинообразования по методическому указанию 4.2.2602-10.4.2 (Москва 2010), после чего лактобациллы выращивали в анаэробе 48 ч. Затем рядом с образовавшимся пятном выросшей культуры капали раствор фермента пепсина 5мкл (1мг/мл) и выдерживали при комнатной температуре 1 час. Затем сверху покрывали вторым слоем мягкого гидролизованного агара (7 мл), засеянного соответствующими энтерококками в концентрации 10⁶ КОЕ/мл, инкубировали 18-20 часов. Проверляли наличие или отсутствие зоны ингибирования индикаторной культуры, а также рост энтерококка на месте нанесения фермента. Выделение и очистку бактериоциноподобных веществ проводили осаждая белки культуральной жидкости 98,55% раствором сульфата аммония, диализовали в диализном мешке размером пор 1000 Да, содержимое диализированного мешка лиофильно высушивали. Сухой экстракт белков в концентрации 25% (0,025 г сухого экстракта растворимый в 100 мкг стерильной дистиллированной воды) использовали для тестирования на наличие бактериоциноподобных веществ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антибактериальное действие лактобацилл к энтерококкам зависит от титра индикаторной культуры энтерококка в верхнем мягком слое гидролизованного агара. Так, при титре клеток индикаторного штамма равном 10⁷КОЕ/мл отсутствует подавление роста энтерококков (кроме штамма 2714), в то время как при снижении титра до 10⁶ КОЕ/мл все энтерококки все энтерококки чувствительны. Лактобациллы по разному проявляют антимикробную к энтерококкам *E.faecium* (таблица 1). Типовой штамм *Lactobacillus plantarum* 8 PA-3 не подавляет рост всех восьми штамма фециума. Штамм *L. plantarum* 42 ингибирует рост всех штаммов энтерококков с зоной бактериоцидного действия от 20 до 28 мм. *L. plantarum* 44 не подавляет рост двух штаммов – М 74 и М 76, к остальным шести штаммам культура активная, зона бактериоцидного действия составляет от 18 до 30 мм. лактобациллы *L. rhamnosus* 41 и *L. casei subsp paracasei* 48 в меньшей степени ингибируют рост энтерококков. Из индикаторных культур наиболее чувствительные к ингибирующему действию лактобацилл штаммы *E.faecium* 2897 и 4605.

Энтерококки *E. faecalis* как типовые, так и местные штаммы чувствительны к антимикробному действию лактобацилл. Из исследованных пяти штаммов кроме штамма 4610, не чувствительного *L. rhamnosus* 41, *L. casei subsp paracasei* 48 чувствительны и чувствительного к двум штаммам *L. plantarum*. Все 5 штаммов чувствительны ко всем видам лактобацилл. Зона бактериоцидного действия лактобацилл к *E. faecalis* значительно большего размера, чем к штаммам *E.faecium*. из исследуемых штаммов лактобацилл наиболее активным является *L. plantarum* 42, который эффективно подавляет рост культур *E.faecium* и *E. faecalis*.

Выявление бактериоциногенных свойств по наличию роста индикаторных культур энтерококков в зоне бактериоцидного действия лактобацилл после деструкции бактериоциноподобных веществ ферментом пепсином, так же, показало что бактериоциногенным свойств обладает только штамм *L. plantarum* 42. Из культур *E.faecium* чувствительны типовые штаммы 2897, М 76, 1026 и местный штамм 364, из 6 культур *E. faecalis* чувствительны 5 штаммов, 3 типовых – 2714, OGIFR 1, FI 2-2 и два местных 422 и 345, не чувствителен штамм 4610.

Для исследования бактериоциногенности к сырому экстракту белков, стерильные бумажные диски размером 5 мм замачивают в растворе накладывают на МРС-агар, затем покрывают вторым слоем мягкого гидролизованного агара с концентрацией энтерококков 10⁶ КОЕ/мл. Отмечали наличие бактериоцидного действия сырого экстракта белков на индикаторную культуру энтерококков. Испытание штамма OGIFR 1 на чувствительность дискодиффузионным методом при внесении в лунку 5 мкл экстракта зона подавления роста составляет 22 мм.

Таблица 1

Антимикробная и бактериоциногенная активность лактобацилл к энтерококкам

№	Индикаторные культуры энтерококков	Испытуемые лактобациллы				
		<i>L. pl-m</i> 8 PA-3	<i>L. pl-m</i> 42	<i>L. pl-m</i> 44	<i>L.rhamnosus</i> 41	<i>L. casei subsp paracasei</i> 48
1.	<i>E.faecium</i> 2897	-	28,0*	28,0	25,0	18,0
2.	K 50	-	24,0	30,0	-	-
3.	M 76	-	26,0*	-	16,0	-
4.	364	-	24,0*	26,0	10,0	10,0
5.	302	-	20,0	18,0	-	-
6.	4605	-	21,0	22,5	22,5	12,5
7.	1026	-	26,2*	27,2	-	-
8.	M 74	-	25,0	-	17,5	-
9.	<i>E. faecalis</i> 2714	22,3	23,3*	21,0	18,0	23,0
10.	422	23,4	19,3*	25,0	22,5	18,0
11.	FI 2-2	10,0	25,4*	19,0	17,5	16,7
12.	345	15,0	25,0*	23,5	25,0	25,0
13.	4610	-	27,4	27,0	-	-
14.	OGFIR 1	10,0	15,0*	25,0	22,5	25,0

Примечание: *Бактериоциногенная активность к энтерококкам

Сопоставление спектра чувствительности индикаторных штаммов энтерококков установленным микробиологическим методом, их чувствительностью к сырому экстракту белков показало совпадение полученных данных из *E. faecium* штаммы 2897, M 76, 364, 1026; из *E. faecalis* 2714, 422, OGIFR 1, FI 2-2, 345.

ВЫВОДЫ

Хорошо известно, что увеличение числа лиц с иммунодефицитными состояниями ведет к нарастанию случаев инфекционных процессов, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, в том числе и энтерококками. В последние десятилетия возросла роль двух видов энтерококков – *E. faecalis* и *E. faecium* – как нозокомиальных патогенов.

Поэтому в настоящее время особый интерес вызывают микроорганизмы, подавляющие рост и развитие фекальных энтерококков. Таким является выделенный из сильнозасоленной капусты местный штамм *L. plantarum* 42, который проявляет антимикробное и бактериоциногенное действие на все виды исследованных энтерококков. Исследования на антимикробную активность лактобацилл по отношению к энтерококкам показали зависимость от видовой и штаммовой принадлежности. Сравнение двух видов энтерококков показало, что энтерококки *E. faecalis* более чувствительны, чем *E. faecium*.

Таким образом, полученный нами местный штамм плантарума *L. pl* 42 может быть пригодным для использования в качестве пробиотического штамма для получения лечебных биопрепаратов, БАДов к пище, а так же пищевых продуктов функционального назначения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриэлян И.Н., Горская Е.М., Спирина Т.С., Преображенская Т.Б. Энтерококки как возбудители инфекционных послеоперационных осложнений. Журн. микробиол. 2007, 4: 50–53.
2. Sarah K.S., Floriana B., Cathcart D.P., Bayley S.A. et al, 1988. Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LP 1010. Appl. Environ. Microbiol., 64, 1871-1877.
3. Daeschel M.A., Kenney Mc M, Donald L.C. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C11. Food Microbiology. 1990, 7, 91-98.
4. Chin H.S., Shim J.M. et al. Detection and antibacterial activity of Bacteriocin A produced by *Lactobacillus plantarum*. Food Science Biotechnol. 2001. Vol. 10. 5. P. 461-467.
5. Hernandez D., Cardell E., Zarate V. Antimicrobiol activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. J. Appl. Microbiol. 2005. 99, 77-84.
6. Kim S.C., Tonkonogy S.L., Albright C.A. et al. Variable Phenotypes of Enterocolitis in interleukin 10 deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. Gastroenterology, 2005: 128, 891-906.