

УДК 636.087.8:579.674:57.083.3

## ВПЛИВ ВНУТРІШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ОРГАНІЗМУ ТВАРИН НА ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ-ПРОБІОТИКІВ

В. О. Агеєв

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: iggardsil@mail.ru

*Представлено результати вивчення впливу внутрішнього середовища організму тварин на збереженість вихідних біологічних властивостей пробіотичних бактерій. Встановлено, що у штаму *Bacillus subtilis* 44-р після транслокації в організм лабораторних кролів на 10–15 % збільшується антагоністична активність, у *B. subtilis* ВЗ спостерігаються зміни морфології колоній (розміру та форми). Разом з тим, властивості досліджених молочнокислих бактерій після перебування у внутрішньому середовищі макроорганізму залишаються без змін.*

Ключові слова: аеробні бацили, молочнокислі бактерії, бактеріальна транслокація, кров, культурально-морфологічні ознаки, фізіолого-біохімічні властивості.

Від самих витоків мікробіологічної науки впродовж тривалого часу уявлення про глибину взаємодії макроорганізму з його мікрофлорою обмежувалися впевненістю у тому, що представники нормоценозу у всій своїй різноманітності мешкають виключно на поверхнях макроорганізму, переважно на епітелії шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Наявність будь-яких мікроорганізмів у крові, а тим більше — у тканинах паренхіматозних органів априорі трактувалося виключно як ознака прогресуючого патологічного стану та(або) як наслідок суттєвого послаблення захисних можливостей організму [1].

Лише наприкінці ХХ ст., переважно в іноземній науковій літературі, з'являється все більше експериментальних даних, що вступають у протиріччя з традиційною думкою щодо механізмів дії пробіотиків на організм тварин та людини. Авторами з різних країн відмічено випадки прояву ефективності пробіотичних препаратів, що не підлягали поясненню з точки зору загальноприйнятого бачення — не лише для лікування інфекцій травного тракту за колонізації кишкового, але й у лікуванні патологічних процесів, що локалізовані поза ШКТ, а саме: поранень зовнішніх покривів, післяопераційних нагно-

ень, пієлонефриту, захворювань дихальних шляхів тощо [2; 3].

Виявлений феномен проникнення бактерій крізь непошкоджену стінку шлунково-кишкового тракту у кров і паренхіматозні органи названо «бактеріальною транслокацією» та вперше описано американським дослідником R. D. Berg у 1985 р. [4].

Вже на початку другого тисячоліття В. І. Нікітенко зі співавт. [5] за допомогою мічених радіоактивним  $H^3$ -лейцином двох штамів сінної палички довели можливість транслокації пробіотичних бактерій зі шлунково-кишкового тракту у кров'яний та лімфатичний потоки. За даними В. І. Нікітенка [6], В. В. Смирнова зі співавт. [7], В. А. Копилова, В. В. Захарова [8], L. de Souza et al. [9], транслокація може бути природним захисним механізмом і обумовлюватися функціями макроорганізму, а не властивостями бактерій. Так, є дані, що бактеріальна транслокація пробіотичних штамів мікроорганізмів та зумовлена нею безсимптомна короткотермінова бактеріємія можуть бути одним із важливих факторів активації та підтримання на достатньому рівні неспецифічної резистентності самого макроорганізму.

Сьогодні актуальною є розробка нових

підходів у стратегії і тактиці створення та застосування біопрепаратів бактеріальної природи, зокрема пробіотиків. А завдяки всебічному дослідженню взаємного впливу макроорганізму та пробіотичних бактерій стає можливим створення ветеринарних та медичних пробіотичних препаратів, призначених для профілактики і лікування не лише розладів роботи травної системи, але й багатьох захворювань сільськогосподарських тварин і людини, що локалізуються поза межами шлунково-кишкового тракту [10–12].

**Матеріали і методи.** У дослідженнях використовували пробіотичні штами *Bacillus subtilis* 44-р (складає основу препарату БПС-44), *B. subtilis* В3, *Lactobacillus plantarum* L5 (входять до складу препарату БПС-Л), *L. plantarum* Lc-18 (перспективний). Для визначення антагоністичної активності використовували патогенні тест-культури *Staphylococcus aureus* 23, *Escherichia coli* 14/1, *Salmonella typhimurium* 12, *Shigella sonnei* 22 з колекції лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Вирощування пробіотичних штамів аеробних бацил та патогенних тест-культур (для визначення антагоністичної активності) здійснювали на стандартних живильних середовищах — м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) та м'ясо-пептонному агарі (МПА), молочнокислих бактерій — на середовищі де Мана (MRS) [13]. Для досліджень бактеріальної транслокації використовували добову культуру.

Дослідження впливу процесу транслокації на культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій-пробіотиків проводили на лабораторних кролях. Для цього створювали групи тварин — одна контрольна та 4 дослідні (за кількістю досліджуваних штамів), по 5 тварин у кожній групі. Перед початком досліду в усіх тварин відбирали та бактеріологічно досліджували кров на наявність у ній аеробних бацил та молочнокислих бактерій.

Досліджувані штами бактерій вводили тваринам *per os*, одноразово, з водою у дозі  $3 \cdot 10^8$  КУО, контрольним тваринам вводили питну воду.

Виділення бактерій з внутрішнього середовища дослідних тварин проводили у моменти їх найбільшого накопичення у кро-

ві, які виявлені у попередніх дослідженнях. Для аеробних бацил цей проміжок складає 5–10 хв. від моменту їх перорального введення, для молочнокислих бактерій — 12–24 год. Чисті культури виділяли методом граничних розведень, використовуючи відповідні живильні середовища, висіви робили з розведень від  $10^0$  (нативний матеріал) до  $10^{-8}$  (для одержання ізольованих колоній).

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з лабораторними тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [19] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [20]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [21].

У вихідних пробіотичних штамів та культур, виділених з крові та органів дослідних тварин вивчали культурально-морфологічні (морфологія клітин та колоній, особливості росту на живильних середовищах) та фізіолого-біохімічні (активність екзоферментів, здатність зброджувати різні джерела Карбону, кількість утвореної кислоти, антагоністична активність) властивості [14–18].

Математичну обробку усіх отриманих результатів, що мають кількісне вираження, здійснювали методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента та коефіцієнтів кореляції [22].

**Результати та обговорення.** В результаті досліджень встановлено, що на вихідні культурально-морфологічні ознаки бактерій промислового пробіотичного штаму *B. subtilis* 44-р їх проходження через внутрішнє середовище організму тварин майже не впливає (табл. 1). Так, ізоляти аеробних бацил, виділені з крові тварин, яким перед цим вводили чисту культуру, за основними ознаками відповідають паспортним даним пробіотичного штаму *B. subtilis* 44-р. Аналогічно поводить себе бактеріальний штам *B. subtilis* В3 з тією відмінністю, що на фіксованому мазку, пофарбованому за Грамом, його клітини, виділені із внутрішнього середовища макроорганізму, товщі на 15–20 % і коротші на 9–12 % порівняно з вихідним пробіотичним бактеріальним штамом.

При порівнянні фізіолого-біохімічних властивостей бактерій *B. subtilis* 44-р та аеробних бацил із крові та паренхіматозних органів дослідних тварин, яким перорально вводили цей пробіотичний штам бактерій (табл. 2), виявлено, що обидві культури ви-

**Таблиця 1. Порівнянняльна характеристика культурально-морфологічних ознак вихідних та транслокованих аеробних бацил-пробіотиків**

Ознаки	<i>B. subtilis</i> 44-р	<i>B. subtilis</i> 44-р після транслокації	<i>B. subtilis</i> В3	<i>B. subtilis</i> В3 після транслокації
Характеристика клітин	Грампозитивні спороутворюючі палички із заокругленими кінцями, рухливі, центральне розміщення спор		Грампозитивні спороутворюючі палички із заокругленими кінцями, рухливі, центральне розміщення спор	
	розмір клітин 3,0–5,0×0,6 мкм	розмір клітин 3,5–5,0×0,6 мкм	розмір клітин 2,5–5,0×0,5 мкм	розмір клітин 2,5–4,0×0,5–0,6 мкм
Ріст на рідких середовищах	На МПБ утворює тонку лускату плівку, під плівкою стовпчик середовища прозорий, має здатність до глибинного росту		На МПБ утворює тонку плівку, під плівкою стовпчик середовища прозорий	
Морфологія колоній на щільному середовищі	На МПА через 18–20 годин утворює блискучі, округлої форми, підвищені колонії, діаметром 3–5 мм; через 24–48 годин — складчасті, матові, з підвищеним центром і хвилястими краями, білуватого кольору, розміром 8–10 мм.		На МПА через 18–20 годин утворює блискучі, округлої форми, підвищені колонії, діаметром 2–3 мм; через 24–48 годин — складчасті, матові, з підвищеним центром і хвилястими краями, білуватого кольору, розміром до 15–17 мм.	
Осмоторантність, % NaCl:				
	4,0	толерантний	толерантний	
	7,0	толерантний	толерантний	
10,0	толерантний		ріст пригнічується	

**Таблиця 2. Фізіолого-біохімічні властивості вихідних пробіотичних штамів аеробних бацил та їх ізолятів з внутрішнього середовища макроорганізму**

Властивості	<i>B. subtilis</i> 44-р	<i>B. subtilis</i> 44-р після транслокації	<i>B. subtilis</i> В3	<i>B. subtilis</i> В3 після транслокації
Зброджування джерел Карбону:				
арабіноза	–			±
галактит	–			–
галактоза	–			–
гліцерин	–			–
глюкоза	+			+
інозит	–			–
інулін	–			–
ксилоза	±			+
лактоза	–			–
мальтоза	+			+
маніт	±			±
маноза	–			–
рамноза	–			–
рафіноза	–			–
сорбіт	–			–
целобіоза	±			–
цукроза	+			+
Ріст у молоці з лакмусом	Відновлення лакмусу		Відновлення лакмусу	
Ферментативна активність	каталаза, ацетилметилкарбінол, амілаза, желатиназа		каталаза, ацетилметилкарбінол, амілаза, казеїназа, нітратредуктаза, уреаза, желатиназа	
Антагоністична активність (зони затримки росту, мм) до:				
<i>S. aureus</i>	8,0	9,0	7,0	
<i>E. coli</i>	6,0	6,5	9,5	
<i>S. typhimurium</i>	2,0	2,0	3,0	
<i>S. sonnei</i>	6,0	7,0	5,5	

являють антагонізм до використаних патогенних тест-культур (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*), при цьому культура, виділена із внутрішнього середовища макроорганізму, володіє антагоністичними властивостями в середньому на 10–15 % більшими порівняно з вихідним штамом.

Бактерії вихідного штаму *B. subtilis* В3 і аеробні бацили, виділені з внутрішнього середовища тварин відповідної дослідної групи (яким вводили цей штам), за усіма дослідженими фізіолого-біохімічними властивостями не відрізняються між собою.

Отже, процес транслокації досліджуваних пробіотичних аеробних бацил в організмі теплокровних тварин спричиняє лише незначні зміни у культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостях пробіотичних бактерій. Зазначені зміни ознак

аеробних бацил можуть бути зумовлені, по-перше, іншим якісним та кількісним складом середовища існування у верхніх відділах ШКТ та у крові тварин, по-друге, іншим температурним режимом порівняно зі стандартними умовами культивування.

Щодо молочнокислих бактерій, встановлено, що вихідні штами *L. plantarum* L5 і *L. plantarum* Lc-18 та бактеріальні культури, виділені з внутрішнього середовища тварин відповідних дослідних групи (яким вводили ці штами), за основними культурально-морфологічними ознаками та фізіолого-біохімічними властивостями були повністю подібними: спостерігалися лише незначні розбіжності (в межах статистичної похибки) у показниках, які мають кількісний вираз — діаметр зон розчинення нерозчинних солей Кальцію та зон затримки росту патогенних тест-культур (табл. 3 і 4).

**Таблиця 3. Культурально-морфологічні ознаки лактобацил-пробіотиків — вихідних та виділених із внутрішнього середовища тварин**

Ознаки	<i>L. plantarum</i> L5	<i>L. plantarum</i> L5 після транслокації	<i>L. plantarum</i> Lc-18	<i>L. plantarum</i> Lc-18 після транслокації
Характеристика клітин	Грампозитивні нерухливі палички правильної форми, спор не утворюють		Грампозитивні нерухливі палички правильної форми, спор не утворюють	
Ріст на рідких середовищах	На MRS утворює осад, що легко збовтується		На MRS утворює пухкий осад, що легко збовтується	
Морфологія колоній на щільному середовищі	У глибині капустиного агару утворює колонії білого кольору, округлої чи зірчастої форми, з вираженими зонами просвітлення середовища		У глибині середовища з крейдою утворює колонії білого кольору, округлої форми, з великими зонами просвітлення середовища	
Осмотолерантність, % NaCl:				
2,0	толерантний		толерантний	
4,0	толерантний		толерантний	
6,0	ріст пригнічується		толерантний	

**Таблиця 4. Порівняння фізіолого-біохімічних властивостей пробіотичних штамів молочнокислих бактерій, що піддавалися транслокації у тканини та органи тваринного організму з вихідними бактеріями**

Властивості	<i>L. plantarum</i> L5	<i>L. plantarum</i> L5 після транслокації	<i>L. plantarum</i> Lc-18	<i>L. plantarum</i> Lc-18 після транслокації
1	2	3	4	5
Зброджування джерел Карбону:				
арабіноза		+		+
галактит		–		–
галактоза		+		+
гліцерин		–		–
глюкоза		+ (без газу)		+ (без газу)
інозит		–		–
інулін		–		–
ксилоза		–		–
лактоза		+		+

1	2	3	4	5
мальтоза	+			+
маніт	+			+
маноза	+			+
рамноза	–			–
рафіноза	+			+
сорбіт	+			+
целобіоза	+			+
цукроза	+			+
Ріст у молоці з лакмусом	Підкислення середовища		Підкислення середовища	
Відновлення метиленового синього	Не відновлює		Не відновлює	
Ферментативна активність	казеїназа		казеїназа, уреаза	
Антагоністична активність (зони затримки росту, мм) до:				
<i>S. aureus</i>	21,0	20,5	27,0	27,0
<i>E. coli</i>	22,0	22,0	31,5	31,0
<i>S. typhimurium</i>	18,0	18,0	22,5	22,5
<i>S. sonnei</i>	19,0	19,5	27,0	27,0

Отже, процес транслокації досліджуваних пробіотичних молочнокислих бактерій у внутрішнє середовище теплокровних тварин не спричиняє таких змін у культурально-морфологічних ознаках та фізіолого-біохімічних властивостях бактерій, які можна було б виявити використаними методами, що може бути пояснено більшою стабільністю їх фенотипу, визначеною впродовж філогенезу, та більшою термостійкістю.

1. Яковлев А. М. К методике исследования неспецифической бактериемии / А. М. Яковлев, О. С. Краснопевцева // Лаб. дело. — 1964. — № 11. — С. 682–684.

2. Никитенко В. И. Некоторые новые данные о механизме действия спорообразующих пробиотиков [электронный ресурс] / В. И. Никитенко, А. В. Бородин, М. В. Никитенко // Esculapus info: электронный медицинский журнал. — 2000. — № 8. — Esculapus, 2000 ; Режим доступа : <http://esculapus.far.ru/vipusk/08/art/005.htm>.

3. Стадников А. А. Влияние транслокации бактерий на регенерацию тканей опорно-двигательной системы при повреждениях / Стадников А. А., Копылов В. А. // Морфофункциональные аспекты регенерации и адаптационной дифференцировки структурных компонентов опорно-двигательного аппарата в условиях механических воздействий : матер. междунар. научн.-практ. конф. — Курган, 2004. — С. 293–295.

4. Berg R. D. Bacterial translocation from the intestines / Rodney D. Berg // Experimental animals. — 1985. — Vol. 34, № 1. — P. 1–16.

5. Никитенко В. И. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта — естественный защитный механизм / Никитенко В. И., Копы-

лов В. А., Никитенко М. В. // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. — 2004. — № 2–3. — С. 16–18.

6. Никитенко В. И. Взаимоотношения макроорганизма и бактерий в ране и тканях человека и животных / В. И. Никитенко // Хирургия. — 1990. — № 9. — 94–98.

7. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* / [В. В. Смирнов, С. Р. Резник, В. А. Вьюницкая и др.] // Микробиол. журн. — 1993. — Т. 55, № 4. — С. 92–112.

8. Копылов В. А. Бактериальная транслокация при термической травме [электронный ресурс] / В. А. Копылов, В. В. Захаров // Esculapus info: электронный медицинский журнал. — 2002. — № 10. — Esculapus, 2002 ; Режим доступа : <http://esculapus.far.ru/vipusk/10/art/005.htm>.

9. Bacterial translocation in acute pancreatitis. Experimental study in rats / [de Souza L., Sampietti S. N., Figueiredo S. et al.] // Revista do hospital das clinicas; Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. — 1996. — Vol. 51, № 4. — P. 116–120.

10. Применение биоспорина в лечении экспериментальной гнойной раны / [Э. В. Горшевикова, Ю. А. Фурманов, А. Т. Слабоспицкая и др.] // Клиническая хирургия. — 1992. — № 9/10. — С. 30–32.

11. Дискуссионные вопросы создания и применения бактериальных препаратов для коррекции микрофлоры теплокровных / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. Б. Сорокулова, В. А. Вьюницкая // Микробиол. журн. — 1992. — Т. 54, № 6. — С. 82–94.

12. Tihole F. Fizioloski pomen bakteriemije z jejunalno mikrofloro / Franc Tihole // Zdravstveni vestnik. — 1982. — Vol. 51, № 1. — P. 3–5.

13. de Mann J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Mann, M. Rogosa, M. Elisabeth Sharpe // Journal of applied bacteriology. — 1960. — Vol. 23, № 1. — P. 130–135.

14. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; пер. с англ.: в 3 т. — М. : Мир, 1983–1984. — Т. 1. — 1983. — 536 с.

15. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; пер. с англ.: в 3 т. — М. : Мир, 1983–1984. — Т. 3. — 1984. — 264 с.

16. Ашмарин И. И. Практическая медицинская микробиология (руководство) / И. И. Ашмарин. — 2-е изд., испр. и доп. — Ташкент : Медицина, 1966. — 324 с.

17. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках : учеб. для студ. биол. спец. ун-тов / Н. С. Егоров. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1986. — 448 с.

18. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников,

О. А. Нестеренко. — М. : Наука, 1975. — 392 с.

19. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [электронный ресурс] // European treaty series. — Strasbourg, 1986. — № 123. — 50 p. — Режим доступа : <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.

20. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // Ендокринологія. — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.

21. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — 86/609/EC. — 20.10.2010 // Official journal of the European Union. — L276/33–79.

22. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин : учеб. пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРЕННЕЙ СРЕДЫ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНЫХ НА СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ-ПРОБИОТИКОВ

**В. А. Агеев**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Представлены результаты изучения влияния внутренней среды организма животных на сохранность исходных биологических свойств пробиотических бактерий. Показано, что у штамма *Bacillus subtilis* 44-p после транслокации в организм лабораторных кролей на 10–15 % повышается антагонистическая активность, у *B. subtilis* B3 наблюдаются изменения морфологии колоний (размера и формы). Вместе с тем, свойства исследованных молочнокислых бактерий после прохождения через внутреннюю среду макроорганизма остаются без изменений.*

Ключевые слова: аэробные бациллы, молочнокислые бактерии, бактериальная транслокация, кровь, культурально-морфологические признаки, физиолого-биохимические свойства.

## THE EFFECT OF INTERNAL ENVIRONMENT OF ANIMALS ON PROPERTIES OF PROBIOTIC BACTERIA

**V. O. Ahejev**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The paper depicts the results of the study of influence of internal environment of animals on preservation of initial biological properties of probiotic bacteria. The increased by 10–15 % antagonistic activity was observed in *Bacillus subtilis* 44-p strain after its translocation to the laboratory rabbits while for *B. subtilis* B3 the changes in the morphology of colonies (size and shape) were noticed. Nevertheless, the properties of the studied lactic acid bacteria after exposition to the internal environment of the macroorganism remain unchanged.*

Key words: *Bacillus subtilis*, lactic acid bacteria, bacterial translocation, blood, cultural-morphological characteristics, physiological and biochemical properties.