



УДК 579.62.864:638.8

В.О. УШКАЛОВ, докт. вет. наук, професор, член-кор. НААН України
Державний науково-контрольний інститут біотехнології
і штамів мікроорганізмів, Київ

П.А. РУДЕНКО, канд. вет. наук, доцент
С.С. БОРДЮГОВА, канд. вет. наук
Луганський національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ РОДІВ *LACTOBACILLUS* ТА *BIFIDOBACTERIUM*

Визначено, що адгезивні властивості виділених від здорових котів культур лакто- і біфідобактерій відносно варіабельні навіть у межах одного виду. Встановлено, що найвищу адгезивну активність мали штам *B. adolescentis* № 23 роду *Bifidobacterium*, а також штами *L. plantarum* № 8, *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 6, *L. rhamnosus* № 26, *L. acidophilus* № 12 та *L. acidophilus* № 24 роду *Lactobacillus*.

Підвищення рівня екологічної безпеки – актуальна проблема сьогодення. У ветеринарній медицині перспективним напрямом зниження антропогенного тиску на довкілля і тварин при запровадженні лікувально-профілактичних заходів є застосування засобів біопрофілактики і біотерапії, альтернативних антибактеріальним препаратам, але подібних за ефективністю. До цієї групи можна віднести пробіотики – засоби, які регулюють і відновлюють мікробіоценоз різних біотопів організму тварин, зокрема шлунково-кишкового тракту, уrogenітальної системи тощо (Л.І. Акименко, 2005; В.С. Підгорський, 2006; Ю.С. Голуб, 2008). Відбір штамів мікроорганізмів, придатних для виробництва пробіотиків, є визначальним етапом під час розроблення препарату й потребує методично правильного проведення досліджень з використанням сучасних методів (В.С. Підгорський, 2006; І.С. Семен, 2009). Важливі характеристики виробничих штамів:

- антагоністична дія на патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми;
- безпечність (нешкідливість) для тварин;
- стійкість до агресивного середовища шлунково-кишкового тракту;
- відсутність генетичної спорідненості з облігатними та умовно-патогенними мікроорганізмами;
- здатність пробіотичних мікроорганізмів активно засвоювати широкий спектр нутрієнтів, присутніх у травно-

му тракті внаслідок біохімічних процесів травлення, тощо (В.В. Смирнов, Н.К. Коваленко зі співавт., 2002).

Проте для створення ефективного пробіотика слід відбирати мікроорганізми, яким властиво колонізувати епітеліальні тканини хазяїна, оскільки достатня кількість клітин штаму-пробіотика, які закріпилися й розмножуються, попереджає накопичення в цій екологічній ніші патогенних мікроорганізмів. Здатність до колонізації надає мікроорганізмам феномен *адгезії* – специфічного прикріплення до рецепторів епітеліоцитів, що забезпечує початковий етап взаємодії мікро- і макроорганізмів. Тобто здатність штамів пробіотиків зв'язуватися з рецепторами епітеліальних клітин забезпечує конкуренцію за ці рецептори з патогенними й умовно-патогенними мікроорганізмами [3, 5, 8, 10]. Таким чином, адгезивність є ключовою ознакою при науковому пошуку, спрямованому на оцінку й відбір штамів – кандидатів у пробіотики.

Мета роботи – вивчити адгезивні властивості у представників аутофлори, ізолюваних від здорових котів, для відбору штамів – кандидатів у пробіотики.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріал для бактеріологічних досліджень відбирали від 18 клінічно здорових котів, які знаходились у притулку для безпритульних тварин ВАТ «Ясинуватський машинобудівний завод» (м. Ясинувата Донецької області).

Ідентифікацію лакто- й біфідофлори здійснювали шляхом визначення культуральних, морфологічних, тинкторіальних і ферментативних властивостей. Усього виділили 37 штамів молочнокислих бактерій, які було віднесено до родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

Визначення адгезивних властивостей ізолюваних штамів молочнокислих мікроорганізмів здійснювали на моделі еритроцитів клінічно здорових котів за методом В.І. Бриллис [3]. Клітинним субстратом були нативні еритроцити котів, двічі промиті 0,1М розчином фосфату натрію (рН 7,2–7,3) за допомогою центрифугування зі швидкістю 300–500 об./хв; концентрація еритроцитів 100 млн/мл. З метою виявлення адгезивності мікроорганізмів до еритроцитів на предметне скло наносили одну краплю буферного розчину, в якому суспендували (мікробіологічною петлею) по одній краплі суміші еритроцитів і мікроорганізмів. Предметне скло поміщали у вологу камеру й інкубували 30 хв за t 37 °С, після чого препарат висушували за тієї ж температури, фіксували метанолом протягом 10 хв і фарбували за Грамом.

Обліковували такі показники: К – коефіцієнт участі еритроцитів в адгезії, відсоток еритроцитів, які мають на своїй поверхні агреговані бактерії; СПА – середній показник адгезії, середня кількість мікроорганізмів на одному еритроциті, що беруть участь в адгезії; ІК – індекс контамінації, кількість бактерій в одному полі зору мікроскопа; ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізмів, який обраховується за формулою: $ІАМ = СПА \times 100 / К$. Крім того, розраховували показник СІА – середній індекс адгезії, середньоарифметичний показник СПА у вибірці.



Підраховували не менше 25 еритроцитів за умови розташування не більше 5 з них в одному полі зору світлового мікроскопа. Адгезивність вважається нульовою при СПА 0,0–1,0, низькою – 1,01–2,0, середньою – 2,01–4,00, високою – при СПА понад 4,0.

Усі розрахунки проводили на персональному комп'ютері за допомогою програми STATISTICA 7.0 (StatSoft, USA) [1]. Отримані результати досліджень обробляли статистично й подавали у вигляді таблиць.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Адгезивність вивчали у 7 представників роду *Bifidobacterium* (3 ізоляти *B. adolescentis* та 4 ізоляти *B. bifidum*) та 30 представників роду *Lactobacillus* (9 ізолятів *L. plantarum*, 10 – *L. rhamnosus* і 11 – *L. acidophilus*) у п'яти повторях.

Результати визначення адгезивних властивостей бактерій роду *Bifidobacterium*, ізольованих від клінічно здорових котів, наведено в табл. 1.

Дані табл. 1 свідчать про те, що виділені культури біфідобактерій мають адгезивний потенціал: CIA мікроорганізмів до еритроцитів котів у вибірці становив 2,56 (від 1,56 до 4,24). Слід зазначити, що лише *B. adolescentis* №23 мав високоадгезивні властивості, при цьому показники становили: СПА – $4,24 \pm 0,41$ бак./ер., К – 88,0%, IAM – 4,81.

Результати визначення адгезивних властивостей виділених штамів бактерій виду *L. plantarum* наведено в табл. 2.

Зазначені дані свідчать, що всі ізоляти *L. plantarum* виявляли високу й середню здатність до адгезії, а саме 5 (55,6%) і 4 (44,4%) виділені штами відповідно. На високоадгезивні властивості виділених культур лактобактерій вказує показник CIA, який становить 4,40 (у межах 2,24–8,28).

Слід зазначити, що найвищу здатність до адгезії мали культури *L. plantarum* №8 (показник СПА – $5,32 \pm 0,26$ бак./ер.) і *L. plantarum* №22 ($8,28 \pm 0,17$ бак./ер.), причому показник К для цих мікроорганізмів в обох випадках становив 100,0%. Крім того, показник IAM у зазначених культур дорівнював

Таблиця 1 – Результати визначення адгезивних властивостей культур бактерій роду *Bifidobacterium*

Ізольовані штами	Показники адгезивності мікроорганізмів до еритроцитів			
	К, %	СПА, бак./ер.	ІК, абс. ч. (%)	IAM
<i>B. adolescentis</i> № 1	76,0	$3,20 \pm 0,44$	27 (33,7)	4,21
Те ж № 23	88,0	$4,24 \pm 0,41$	26 (24,5)	4,81
– // – № 28	72,0	$2,56 \pm 0,37$	16 (25,0)	3,55
<i>B. bifidum</i> № 7	68,0	$1,56 \pm 0,27$	14 (35,8)	2,29
Те ж № 13	80,0	$2,12 \pm 0,31$	11 (20,7)	2,65
– // – № 18	72,0	$1,92 \pm 0,29$	13 (27,1)	2,66
– // – № 32	64,0	$2,32 \pm 0,39$	18 (31,0)	3,62
CIA			2,56	

Таблиця 2 – Результати визначення адгезивних властивостей культур *L. plantarum*

Ізольовані штами	Показники адгезивності мікроорганізмів до еритроцитів			
	К, %	СПА, бак./ер.	ІК, абс. ч. (%)	IAM
<i>L. plantarum</i> № 3	88,0	$4,80 \pm 0,43$	18 (15,0)	5,45
Те ж № 8	100,0	$5,32 \pm 0,26$	33 (24,8)	5,32
– // – № 10	84,0	$3,44 \pm 0,37$	14 (16,3)	4,09
– // – № 22	100,0	$8,28 \pm 0,17$	43 (20,3)	8,28
– // – № 25	68,0	$2,24 \pm 0,36$	17 (30,3)	3,29
– // – № 27	76,0	$3,52 \pm 0,46$	24 (27,3)	4,63
– // – № 31	76,0	$3,64 \pm 0,46$	28 (30,7)	4,78
– // – № 34	92,0	$4,32 \pm 0,35$	24 (22,2)	4,69
– // – № 37	84,0	$4,04 \pm 0,46$	27 (26,7)	4,80
CIA			4,40	

Таблиця 3 – Результати визначення адгезивних властивостей культур *L. rhamnosus*

Ізольовані штами	Показники адгезивності мікроорганізмів до еритроцитів			
	К, %	СПА, бак./ер.	ІК, абс. ч. (%)	IAM
<i>L. rhamnosus</i> № 5	80,0	$2,40 \pm 0,31$	14 (23,3)	3,00
Те ж № 6	92,0	$5,04 \pm 0,40$	19 (15,1)	5,47
– // – № 11	92,0	$3,84 \pm 0,38$	18 (18,7)	4,17
– // – № 20	76,0	$3,16 \pm 0,42$	24 (30,4)	4,15
– // – № 26	88,0	$6,16 \pm 0,51$	36 (23,4)	7,00
– // – № 29	88,0	$4,28 \pm 0,41$	24 (22,4)	4,86
– // – № 30	88,0	$4,24 \pm 0,40$	29 (27,3)	4,81
– // – № 33	72,0	$1,92 \pm 0,31$	11 (22,9)	2,66
– // – № 35	68,0	$2,32 \pm 0,37$	19 (32,7)	3,41
– // – № 36	64,0	$1,36 \pm 0,26$	7 (20,5)	2,12
CIA			3,47	

Таблиця 4 – Результати визначення адгезивних властивостей культур *L. acidophilus*

Ізольовані штами	Показники адгезивності мікроорганізмів до еритроцитів			
	К, %	СПА, бак./ер.	ІК, абс. ч. (%)	IAM
<i>L. acidophilus</i> № 2	80,0	$4,60 \pm 0,53$	27 (23,5)	5,75
Те ж № 4	88,0	$4,72 \pm 0,45$	20 (16,9)	5,36
– // – № 9	88,0	$4,20 \pm 0,38$	22 (20,9)	4,77
– // – № 12	96,0	$5,00 \pm 0,33$	29 (23,2)	5,20
– // – № 14	88,0	$3,88 \pm 0,38$	21 (21,6)	4,40
– // – № 15	80,0	$4,68 \pm 0,53$	30 (25,6)	5,85
– // – № 16	88,0	$3,72 \pm 0,40$	24 (25,8)	4,22
– // – № 17	92,0	$4,24 \pm 0,38$	20 (18,8)	4,60
– // – № 19	88,0	$4,40 \pm 0,40$	24 (21,8)	5,00
– // – № 21	72,0	$3,72 \pm 0,53$	25 (26,8)	5,16
– // – № 24	92,0	$6,24 \pm 0,46$	33 (21,1)	6,78
CIA			4,49	



5,32 та 8,28 відповідно, а показники ІК були найвищими – 33 (24,8%) і 43 (20,3%) бактерії в одному полі зору мікроскопа відповідно.

Результати визначення адгезивних властивостей культур бактерій виду *L. rhamnosus*, ізольованих від клінічно здорових котів, наведено в табл. 3.

Наведені в табл. 3 дані свідчать, що лише 2 (20,0%) культури *L. rhamnosus* було віднесено до штамів з невисокою здатністю до адгезії, тоді як інші мікроорганізми цієї групи мали середню й високу адгезивну активність – показник СІА у вибірці становив 3,47 (1,36–6,16), що свідчить про середній рівень здатності культур до адгезії.

Дані цієї таблиці також засвідчують, що найвищу адгезивну активність мали культури *L. rhamnosus* №6 з показниками: СПА – $5,04 \pm 0,40$ бак./ер., К – 92,0% і *L. rhamnosus* №26: СПА – $6,16 \pm 0,51$ бак./ер., К – 88,0%, ІАМ – 7,00. При цьому показник ІК для цих культур становив 19 (15,1%) і 36 (23,4%) бактерій в одному полі зору мікроскопа відповідно.

Результати визначення адгезивних властивостей культур бактерій виду *L. acidophilus* наведено в табл. 4.

Одержані результати свідчать, що всі досліджені культури *L. acidophilus* були здатні до адгезії й характеризувалися середньою і високою адгезивністю. Так, більшість (8, або 72,7%) ізольованих культур лактофлори мали високий рівень здатності до адгезії, а решта (3, або 27,3%) продемонструвала середній рівень адгезивної активності. Показник СІА у вибірці виділених культур мікроорганізмів дорівнював 4,49 (коливався в межах 3,72–6,24), що можна вважати здатністю до адгезії високого ступеня.

Дані табл. 4 свідчать про те, що найвищу адгезивну активність спостерігали в *L. acidophilus* №12, показники якого дорівнювали: СПА – $5,00 \pm 0,33$ бак./ер., К – 96,0%, ІАМ – 5,20, та *L. acidophilus* №24: СПА – $6,24 \pm 0,46$ бак./ер., К – 92,0%, ІАМ – 6,78. При цьому показник ІК для цих культур становив 29 (23,2%) і 33 (21,1%) бактерії в одному полі зору мікроскопа відповідно.

ВИСНОВОК

Було відібрано культури мікроорганізмів, представників аутофлори здорових котів, з високим адгезивним потенціалом – *Bifidobacterium adolescentis* №23, *Lactobacillus plantarum* №8, *Lactobacillus plantarum* №22, *Lactobacillus rhamnosus* №6, *Lactobacillus rhamnosus* №26, *Lactobacillus acidophilus* №12 і *Lactobacillus acidophilus* №24, які можна використовувати як виробничі, зокрема під час виготовлення засобів біопрофілактики й біотерапії розладів функції шлунково-кишкового тракту тощо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. – 2-е изд. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.
2. Воробьев А.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины / А.А. Воробьев, К.А. Абрамов, В.И. Бондаренко // Вестник Рос. АМН. – 1996. – №11. – С. 4–7.
3. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Бриллис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер [и др.] // Лабораторное дело. – 1986. – С. 210–212.
4. Применение мультипробиотика «Симбистер концентрированный» в лечении больных хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта / Н.В. Харченко, В.В. Черненко, Д.С. Янковский [и др.] // Здоровье женщины. – 2003. – №2 (14). – С. 1–7.
5. Семен І.С. Система оцінки мікроорганізмів при конструюванні пробіотиків: дис. ... канд. сільгосп. наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія / Ін-т біології тварин УААН. – Львів, 2009. – Рукопис.
6. Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women / S.P. Dimitonova, S.T. Danova, J.P. Serkedjieva [et al.] // Anaerobe. – 2007. – №3. – P. 219–224.
7. Pal A. Microflora of the natural orifices of healthy yaks / A. Pal, B.C. Kar // Indian. J. Anim. Sc. – 2000. – Vol. 70. – №8. – P. 820–822.
8. Probiotic properties of industrial strains of lactobacilli and bifidobacteria / N.K. Kovalenko, O.P. Livins'ka, O.A. Poltav'ska [et al.] // Mikrobiol. Z. – 2010. – №72 (1). – P. 9–17.
9. Shibusawa T. Prevalence of *Streptococcus mutans* as an oral flora of dogs kept indoors / T. Shibusawa, T. Tsurumizu, T. Hashimoto //

J. Japan Veter. Med. Ass. – 1991. – №5. – P. 512–514.

10. Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B / S. Górski-Frączek, C. Sandström, L. Kenne [et al.] // Carbohydr. Res. – 2011. – №346 (18). – P. 926–932.
11. Surface displaced alpha-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein / C. Castaldo, V. Vastano, R.A. Siciliano [et al.] // Microb. Cell. Fact. – 2009. – Vol. 16. – P. 8 14.

Одержано 21.11.2012

Изучение адгезивных свойств бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. В.А. Ушкалов, П.А. Руденко, С.С. Бордюгова

Определено, что адгезивные свойства выделенных от здоровых кошек культур лакто- и бифидобактерий относительно вариабельны даже в пределах одного вида. Установлено, что наиболее высокой адгезивной активностью обладали штамм *B. adolescentis* №23 рода *Bifidobacterium*, а также штаммы *L. plantarum* №8, *L. plantarum* №22, *L. rhamnosus* №6, *L. rhamnosus* №26, *L. acidophilus* №12 и *L. acidophilus* №24 рода *Lactobacillus*. В экологических нишах организма кошек перечисленные изоляты могут эффективно конкурировать за рецепторы с условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. Поэтому их можно рассматривать в качестве культур-кандидатов в пробиотические препараты для лечения и профилактики хирургической инфекции у данного вида животных.

The study of the adhesive properties of bacteria of the genera *Lactobacillus* strains that *Bifidobacterium*. V.A. Ushkalov, P.A. Rudenko, S.S. Borydyugova

Shown that the adhesive properties of the isolates from healthy cats cultures lacto- and bifidobacteria are variable with respect, even within the same species. Established that the activity has a high adhesive strain *B. adolescentis* №23 genus *Bifidobacterium*, as well as strains of *L. plantarum* №8, *L. plantarum* №22, *L. rhamnosus* №6, *L. rhamnosus* №26, *L. acidophilus* №12 and *L. acidophilus* №24 genus *Lactobacillus*. In the ecological niches of the body of cats listed isolates can effectively compete for receptors with opportunistic and pathogenic microorganisms. They can therefore be considered as crops candidate probiotic preparations for the treatment and prevention of surgical infection in this animal species. ☉