

УДК 615.331+579.83+579.22+616.34-008.8+616-092.9+547.462.3

Г.П. Гаморак

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРИНУ СТОСОВНО ПАТОГЕННИХ ТА УМОВНО-ПАТОГЕННИХ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ТА ІНШИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, ЯКІ ФОРМУЮТЬ ДИСБАКТЕРІОЗ КИШЕЧНИКУ БІЛИХ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ АПЛІКАЦІЇ ІТАКОНОВОЇ КИСЛОТИ

Державний вищий навчальний заклад «Івано-Франківський національний медичний університет»

Резюме. У роботі наведені результати вивчення антимікробної активності лактобактерину стосовно патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів, дріжджоподібних грибів, які формують дисбактеріоз кишечника експериментальних тварин під впливом щоденних аплікацій на шкіру ітаконової кислоти протягом 20 днів. Лактобактерин проявляє високу антимікробну активність стосовно патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій (*E. coli* Ну+, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*), стафілококів і дріжджоподібних

грибів роду *Candida*, кількість яких суттєво зростає після 20-денної аплікації ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² на непошкоджену шкіру експериментальних тварин, формуючи дисбактеріоз кишечника. Одержані результати *in vitro* дозволяють рекомендувати лактобактерин для корекції сформованого дисбактеріозу та профілактики його розвитку.

Ключові слова: лактобактерин, ентеробактерії, стафілококи, дріжджоподібні гриби роду *Candida*.

Вступ. Нормальна мікрофлора хазяїна розглядається як специфічний мікробний орган, який чинить суттєвий вплив на структурно-функціональний стан внутрішніх органів, системи імунітету та процеси регуляції усіх життєво важливих функцій. При цьому макроорганізм є не лише поживним середовищем (персистенції) для екзогенної для нього мікрофлори. Перебуваючи у стані динамічної рівноваги з власними біоценозами, організм хазяїна є частиною мікроекологічної системи, причому мікробна складова цієї системи містить кількість прокаріотичних клітин, що значно перевищує сумарне число еукаріотичних клітин усіх інших органів і систем організму людини або тварин. Це засвідчує про величезну роль у життєдіяльності організму людини її мікророскопічних симбіотичних партнерів [1].

У попередніх роботах [2, 3, 4] показано, що 20-денна аплікація на непошкоджену шкіру білих щурів ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² призводить до порушень мікробіоценозу вмісту порожнини і приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої і дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин за рахунок формування дефіциту автохтонних облигатних анаеробних бактерій та суттєвого зростання кількості патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів, дріжджоподібних грибів роду *Candida* та інших умовно-патогенних мікроорганізмів. Показано, що самовідновлення мікробіоти цього біотопу проходить повільно. Для відновлення якісного і кількісного складу мікробіоти кишечника використовують пробіотики із представників ендогенної мікрофлори цього біотопу, яка проявляє високу антагоністичну активність. Тому перед використанням пробіотиків необхідно встановити антимікробну активність пробіотиків, які будуть використовуватися для корекції мікробіоценозу.

Мета дослідження. Встановити антимікробну активність лактобактерину стосовно патоген-

них (ентеротоксигенних ешерихій) та умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів, дріжджоподібних грибів роду *Candida in vitro* для виявлення можливості використання в лікуванні дисбактеріозу, спричиненого ітаконовою кислотою.

Матеріал і методи. У роботі використаний лактобактерин сухий, виробництва ФДУП «НВО Мікроген» МОЗ РФ, м. Перм. Сертифікат державної реєстрації № 82/08 300200000 від 19.03.2008, який зберігався за умов, вказаних у інструкції про застосування.

Як тест-штами були відібрані свіжовиділені штами ентеротоксигенних ешерихій та умовно-патогенних ентеробактерій (*E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*), стафілококів і дріжджоподібних грибів роду *Candida*.

Антимікробну активність лактобактерину визначали шляхом сумісного культивування в еквівалентних концентраціях лактобактерій і тест-мікробів у рідкому поживному середовищі МРС-4, оптимальному для росту і розмноження лактобацил.

Через певні проміжки культивування (через 24, 48, 72, 96 год і 7 діб) відбирали проби асоціативних культур. Із проб готували серійні десятикратні (10^{-2} - 10^{-10}) розведення і з них робили посіви 0,01мл на тверде поживне середовище, розтираючи рівномірно на поверхні стерильним скляним шпателем. Після культивування посівів одержували колонії. Однотипні колонії підраховували для встановлення популяційного рівня. Ідентифікацію колоній здійснювали за морфологічними, тинкторіальними, культуральними і біохімічними властивостями [5, 6]. Враховуючи те, що в 1 мл середовища кількість мікроорганізмів досягає мільйонів мікробних клітин, для зручності викладу матеріалу і статистичного опрацювання використовували десятковий логарифм кількісного показника мікробіоти (lg КУО/мл).

Одержані цифрові результати досліджень опрацьовані за загальноприйнятими математич-

но-статистичними методами з використанням критерію Стьюдента. Статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення на персональному комп'ютері IDM RC з використанням критерію (t) при нормальному розподіленні величин, що аналізуються. Різницю між порівнювальними величинами вважали вірогідною при $P \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Відомо, що два чи більше видів мікроорганізмів не можуть стабільно та, що дуже важливо, тривало існувати в одному біотопі, якщо їхня ніша сумісного проживання обмежена в просторі та при цьому вони мають ідентичні поживні потреби. У нашому випадку штучно змішані в еквівалентних кількостях два види – лактобацили та один із видів ентеробактерій, стафілокок і дріжджоподібні гриби роду *Candida*. Виходячи з того, що вони не можуть тривалий час існувати, нами проводились експерименти протягом семи діб, вивчаючи популяційний рівень тест-мікроба через 24, 48, 72, 96 годин та сім діб. Результати вивчення чутливості патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій до лактобактерину, залежно від періоду сумісного культивування, наведені в таблиці 1.

Патогенні та умовно-патогенні ешерихії, едвардсієли і клебсієли в поживному середовищі, оптимальному для лактобацил, швидко ростуть і розмножуються. Через 24 год їх популяційний рівень зростає на 41,3, 45,0, 42,7 % і на 56,4 % відповідно (на три і більше порядків). Популяційний рівень цих мікроорганізмів продовжує зростати на 52,8, 59,3, 47,1 % і на 65,2 % порівняно з вихідним популяційним рівнем і через 48 годин. Він продовжує зростати і протягом 72 год на 61,8, 62,0, 65,1 % і на 62,1 % відповідно. Але через 96 годин популяційний рівень не зростає і формується тенденція до зниження популяційного рівня цих мікроорганізмів і вже через сім діб настає зменшення кількості життєздатних патогенних і умовно-патогенних ентеробактерій. Таким чином, поживне середовище є досить прекрасним для росту і розмноження патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій.

Сумісне культивування патогенних (*E.coli* Н1у+) та умовно-патогенних (*E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*) із лактобацилами (*L. plantarum* 8P-A3, або *L. plantarum* 38, або *L. fermentum* 90T-C4, або *L. fermentum* 39) призводить до суттєвого зниження популяційного рівня ентеробактерій. Так, популяційний рівень ентеротоксигенних ешерихій через 24 год культивування за наявності лактобактерій знизився на 7,4 %, через 48 год – на 36,6 %, через 72 год – на 59,0 %, через 96 год – на 67,0 % та через сім діб – на 96,9 %. Більш суттєве зниження популяційного рівня відмічено у звичайних кишкових паличок. Уже через 24 год їх популяційний рівень знизився на 29,7 %, через 48 год – на 43,9 %, через 72 год – на 39,1 %, через 96 год – на 56,7 %, а через сім діб – на 58,9 %. Подібне зниження популяційного рівня встанов-

лено в едвардсієл на 28,8, 38,1, 60,5, 94,2 % і у 2 рази (2,1 раза) залежно від терміну дослідження, а також у клебсієл. Їх популяційний рівень через 24 год знизився на 23,5 %, через 48 год – на 39,0 %, через 72 год – на 58,9 %, через 96 год – на 70,9 % і через сім діб – на 88,9 %.

Таким чином, лактобацили характеризуються високою активністю щодо кислотоутворення, вираженим антагоністичним ефектом щодо патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій, доброю виживаністю в біотопах із ентеробактеріями. Антимікробна активність лактобактерину реалізується за рахунок синтезу молочної кислоти, перекису водню, лізоциму, бактеріоцинів, які інгібують життєдіяльність патогенних і умовно-патогенних ентеробактерій. Встановлено надзвичайно широкий спектр синтезованих лактобацилами бактеріоцинів, лактоцинів, плантацину, курвацину, азидоцину, аміловорину, баварицину, казеїцину, сакацину і багато інших [1]. Все перераховане сприяє високій бактерицидній активності лактобактерину, який доцільно використовувати для деконтамінації із біотопів патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій та корекції якісного і кількісного складу мікробіоти певного біотопу.

Результати вивчення впливу лактобактерину на ріст і розмноження стафілокока і дріжджоподібних грибів роду *Candida*, виділених від тварин, яким протягом 20 днів проводилась аплікація ітаконової кислоти на непошкоджену шкіру білих щурів у дозі 20 мг/см², наведені в таблиці 2.

Показано, що стафілококи і дріжджоподібні гриби роду *Candida* в середовищі ростуть і розмножуються протягом перших 24, 48, 72, 96 годин. У подальшому (через сім діб) їх популяційний рівень не зростає або навіть знижується (*S. albicans*). Сумісне культивування золотистого стафілокока з лактобактерином призводить до зниження його популяційного рівня, яке залежить від періоду культивування. Так, через 24 год сумісного культивування лактобактерину і *S. aureus*, популяційний рівень останнього знижується на 8,7 %, а вже через 48 год – на 33,2 %, через 96 год – на 58,1 % та через сім діб – на 78,4 %. При сумісному культивуванні лактобактерину і дріжджоподібних грибів роду *Candida* популяційний рівень останніх також понижується вже через 24 год на 19,5 %, через 48 год – на 15,0 %, через 72 год – на 33,0 %, через 96 год – на 35,1 % та через сім діб на 64,0 %.

Таким чином, лактобактерин не тільки проявляє антимікробну активність стосовно патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій, а також, що важливо, по відношенню до стафілококів і дріжджоподібних грибів роду *Candida*, популяційний рівень яких зростає при 20-денних аплікаціях на непошкоджену шкіру білих щурів ітаконової кислоти (одного з важливих компонентів сучасних миючих засобів) у дозі 20 мг/см².

Таким чином, за даними табл. 1 і 2 лактобактерин може бути використаний для корекції порушеного мікробіоценозу за рахунок аплікації

Таблиця 1

Антимікробна активність лактобактериу стосовно патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій *in vitro*

Термін дослідження	E. coli			E. coli Hly+			E. tarda			K. pneumoniae		
	К	Д	Р	К	Д	Р	К	Д	Р	К	Д	Р
Вихідні показники	7,03±0,02	7,08±0,02	> 0,05	7,02±0,04	7,09±0,04	> 0,05	7,03±0,02	7,03±0,02	> 0,05	6,99±0,03	6,99±0,03	> 0,05
Через 24 год культивування	10,19±0,05	5,46±0,03	< 0,001	9,92±0,06	6,60±0,02	< 0,001	10,03±0,02	5,46±0,04	< 0,001	10,93±0,06	5,66±0,05	< 0,001
	< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,001	
Через 48 год культивування	11,20±0,08	4,42±0,05	< 0,001	10,73±0,07	5,19±0,09	< 0,001	10,34±0,04	5,09±0,07	< 0,001	11,55±0,03	5,03±0,04	< 0,001
	< 0,001	< 0,01		< 0,01	< 0,001		< 0,01	< 0,05		< 0,01	< 0,001	
Через 72 год культивування	11,39±0,07	4,09±0,08	< 0,001	11,36±0,03	4,46±0,04	< 0,001	11,61±0,03	4,38±0,04	< 0,001	11,33±0,09	4,40±0,04	< 0,001
	> 0,05	< 0,01		< 0,01	< 0,001		< 0,001	< 0,01		< 0,05	< 0,05	
Через 96 год культивування	11,14±0,03	3,60±0,02	< 0,001	11,16±0,04	4,24±0,05	< 0,001	10,99±0,02	3,62±0,03	< 0,001	10,78±0,03	4,09±0,05	< 0,001
	< 0,05	< 0,01		< 0,05	< 0,05		< 0,001	< 0,001		< 0,01	< 0,01	
Через 7 діб культивування	10,04±0,07	3,56±0,05	< 0,001	9,76±0,09	3,60±0,03	< 0,001	10,36±0,05	3,40±0,02	< 0,001	10,31±0,02	3,70±0,04	< 0,001
	< 0,01	> 0,05		> 0,05	< 0,01		< 0,01	< 0,01		< 0,001	< 0,01	

Примітка. К – популяційний рівень культури через відповідний період культивування без пробіотика; Д – популяційні культури на середовищі, яке містить еквівалентну кількість лактобакте-
риу; Р – порівняння з контрольними показниками

Таблиця 2

Антимікробна активність лактобактерину стосовно стафілокока і дріжджоподібних грибів роду *Candida in vitro*

Термін дослідження	<i>S. aureus</i>			<i>C. albicans</i>		
	К	Д	Р	К	Д	Р
Вихідні показники популяційного рівня (в lgКУО/мл)	7,10±0,02	7,10±0,02	>0,05	7,05±0,02	7,05±0,02	>0,05
Через 24 години культивування	8,49±0,07	6,53± 0,04	< 0,001	7,66± 0,03	5,90± 0,07	< 0,001
P ₁	< 0,001	< 0,001		< 0,01	< 0,001	
Через 48 годин культивування	9,78±0,07	5,33± 0,07	< 0,001	7,42±0,03	6,13± 0,04	< 0,001
P ₂	< 0,001	< 0,001		< 0,001	< 0,05	
Через 72 години культивування	10,68±0,05	5,84± 0,07	< 0,001	9,26±0,02	5,30± 0,03	< 0,001
P ₃	> 0,01	< 0,01		< 0,001	< 0,001	
Через 96 годин культивування	10,20±0,02	4,49± 0,03	< 0,001	10,08±0,05	5,22± 0,05	< 0,001
P ₄	< 0,01	< 0,001		< 0,001	>0,05	
Через 7 діб культивування	10,29±0,02	3,98± 0,05	< 0,001	8,83± 0,03	4,30± 0,03	< 0,001
P ₅	< 0,01	<0,01		<0,001	< 0,001	

Примітка. К – контроль (популяційний рівень культури на поживному середовищі без пробіотиків); Д – популяційний рівень культури на середовищі, що містить еквівалентну кількість лактобактерину; P₁₋₅ – порівняння з попередніми показниками; Р – порівняння з контрольними показниками

ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² протягом 20 днів на непошкоджену шкіру експериментальних тварин, а також можливість його призначення для профілактики розвитку дисбактеріозу, що розвивається за аплікацій ітаконової кислоти.

Висновок

Лактобактерин проявляє високу антимікробну активність стосовно патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій (*E. coli* Нly+, *E. coli*, *E. tarda*, *K.pneumoniae*), стафілококів і дріжджоподібних грибів роду *Candida*, кількість яких суттєво зростає після 20-денної аплікації ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² на непошкоджену шкіру експериментальних тварин, формуючи дисбактеріоз кишечника. Одержані результати *in vitro* дозволяють рекомендувати лактобактерин для корекції сформованого дисбактеріозу та профілактики його розвитку.

Перспективи подальших досліджень. Одержані результати є підставою для вивчення деконтамінуючої і корегувальної дії лактобактерину на порушений мікробіоценоз кишечника експериментальних тварин у результаті дії ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² при аплікації на непошкоджену шкіру протягом 20 днів. Одержані

результати *in vivo* дозволить рекомендувати пробіотик для відновлення порушеного мікробіоценозу та профілактики формування дисбактеріозу кишечника.

Література

- Широбоков В.П. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом / В.П. Широбоков, Д.С. Янковський, Г.С. Димент. – К.: ТОВ «Червона Рута – Туре», 2009. – 312 с.
- Гаморак Г.П. Ефективність процесу самовідновлення мікрофлори вмісту порожнини товстої кишки білих шурів після 20-денної аплікації на непошкоджену шкіру ітаконової кислоти в дозі 20 мг/см² / Г.П. Гаморак // Клін. та експерим. патол. – 2011. – Т. X, № 3. – С. 71-75.
- Гаморак Г.П. Процес самовідновлення якісного і кількісного складу мікробіоти приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої кишки білих шурів після 20-денної аплікації на шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см² / Г.П. Гаморак // Бук. мед. вісник. – 2011. – № 4. – С. 87-91.
- Куцик Р.В. Вплив 20-денних аплікацій на шкіру ітаконової кислоти у дозі 20 мг/см² на мік-

- рофлору порожнини дистального відділу тонкої кишки та процес її самовідновлення через 15 днів / Р.В. Куцик, Г.П. Гаморак // Гал. лікар. вісник. – 2011. – № 3. – С. 44-47.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / D.R. Boone, R.W. Gastenhdz, M. George [et al.]. – New York: Springer – Verlag, 2001. – P. 56-59.
6. Dobler G. Recent taxonomic changes and update of nomenclature for bacteria identified in clinical material / G. Dobler, I. Braveny // Eur. J. Clin. Microbiol. infect. Dis. – 2003. – Vol. 22. – P. 643-646.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАКТЕРИНА ПО ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И ДРУГИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ФОРМИРУЮЩИХ ДИСБАКТЕРИОЗ КИШЕЧНИКА БЕЛЫХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ АППЛИКАЦИИ ИТАКОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Г.П. Гаморак

Резюме. В работе приведены результаты изучения антимикробной активности лактобактерина по отношению патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, стафилококков, дрожжеподобных грибов, формирующих дисбактериоз кишечника экспериментальных животных под влиянием ежедневных аппликаций на кожу итаконической кислоты в течение 20 дней. Лактобактерин проявляет высокую антимикробную активность относительно патогенных и условно-патогенных энтеробактерий (*E. coli* Hly +, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*), стафилококков и дрожжеподобных грибов рода *Candida*, количество которых существенно возрастает после 20-дневной аппликации итаконической кислоты в дозе 20 мг/см² на неповрежденную кожу экспериментальных животных, формируя дисбактериоз кишечника. Полученные результаты *in vitro* позволяют рекомендовать лактобактерин для коррекции сложившегося дисбактериоза и профилактики его развития.

Ключевые слова: лактобактерин, энтеробактерии, стафилококки, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTOBACTERINUM IN RELATION TO PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC ENTEROBACTERIA AND OTHER MICROORGANISMS, FORMING DYSBACTERIOSIS OF THE INTESTINE OF ALBINO RATS UNDER THE EFFECT OF ITAKONIC ACID APPLICATION

Г.П. Гаморак

Abstract. The paper submits the results of studying the antimicrobial activity of Lactobacterinum in relation to pathogenic and opportunistic enterobacteria, staphylococci, yeast-like fungi, forming dysbacteriosis of the intestine of experimental animals under the influence of daily applications on the skin of itakonic acid during 20 days. Lactobacterinum manifest a high antimicrobial activity in relation to pathogenetic and opportunistic enterobacteria (*E. coli* Hly+, *E. coli*, *E. tarda*, *K. pneumoniae*), staphylococci and yeast-like fungi of the *Candida* genus whose number essentially increases following a 20 day application of itakonic acid in a dose of 20 mg/cm³ on the intact skin of experimental animals, forming intestinal dysbacteriosis. The result obtained *in vitro* enable to recommend Lactobacterinum to correct formed dysbacteriosis and prevent its development.

Key words: Lactobacterinum, enterobacteria, staphylococci, yeast-like fungi of *Candida* genus.

National Medical University (Ivano-Frankivsk)

Рецензент – проф. І.Й. Сидорчук

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 2 (62). – P. 38-42

Надійшла до редакції 22.02.2012 року