УДК 579.222:579.864:579.62

СКРИНИНГ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Н. А. ГОЛОВНЁВА[1], М. Е. САФОНОВА[1], А. Н. МОРОЗОВА[1], Н. Е. РЯБАЯ[1], А. А. САМАРЦЕВ[1], А. Н. МИХАЛЮК[2]

[1]Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь, biochem_lab@mbio.bas-net.by
[2]Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Беларусь, ggau@ggau.by

Приведены результаты скрининга молочнокислых бактерий, перспективных для использования в профилактике и лечении эндометритов у коров. Исследованы особенности роста и кислотообразования, антимикробная активность, а также способность молочнокислых бактерий к адгезии. Составлен консорциум бактерий с пробиотическими свойствами *Lactobacillus rhamnosus* M8, *Lactobacillus fermentum* M9, *Lactobacillus plantarum* HE-2 и *Lactococcus lactis* AB-32, характеризующихся стабильным ростом, высокой кислотообразующей активностью, адгезией к белковым лигандам, а также подавлением роста *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и патогенов, изолированных из экссудата полости матки коров с послеродовым эндометритом.

Введение. В современных условиях ведения молочного животноводства эндометриты являются одной из главных причин, сдерживающих повышение молочной продуктивности у коров, приводящих к экономическим потерям, связанным как с расстройством репродуктивной функции и лактации, так и с большими затратами на их лечение. Установлено, что эндометрит в большинстве случаев вызывают ассоциации микроорганизмов родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonos*, *Bacillus*, *Candida* [1, 2]. В настоящее время, исходя из полиэтиологичности заболевания, в лечении эндометрита широко используют нитрофурановые, сульфаниламидные и антибиотические препараты, которые, как известно, часто ингибируют факторы

локальной и общей резистентности животных. Действуя не только на патогенную, но и на полезную микрофлору, антибиотикотерапия является для животного мощным фактором дисбиоза, приводит к селекции высокорезистентных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также к активизации условно-патогенных компонентов микробиоценоза организма-хозяина [3, 4]. В животноводстве и ветеринарии для профилактики и лечения эндометрита перспективно использование препаратов на основе представителей нормофлоры урогенитального тракта животных, которые обладают не только антагонистическим действием по отношению к патогенным бактериям, но одновременно стимулируют защитные механизмы организма животного от проникновения чужеродных микроорганизмов и развития воспалительных процессов [5–9].

Известно, что антагонистическое действие нормальной микробиоты организма связано с образованием молочной, уксусной и других кислот, синтезом специфических веществ (например, бактериоцинов), подавляющих рост патогенов, а также адгезивной способностью резидентных видов микробиоценоза, что предотвращает заселение биотопа посторонними микроорганизмами [10]. Имеются данные о том, что штаммы, относящиеся к одному виду, могут существенно отличаться по уровням адгезивной и антагонистической активности. Восстановление колонизационной резистентности слизистых оболочек внутренних органов целесообразно проводить, используя высокоадгезивные штаммы пробиотических микроорганизмов. Популяционный уровень бифидобактерий и лактобацилл, например в микробиоценозе кишечника, прямо зависит от их адгезивных характеристик, тогда как связь между адгезивной активностью и количеством условно-патогенных микроорганизмов не выявлена [11].

Целью настоящего исследования явился скрининг штаммов молочнокислых бактерий, перспективных для включения в состав препаратов для защиты животных от заболеваний урогенитального тракта. Основное внимание уделялось исследованию антимикробной активности, а также способности молочнокислых бактерий к адгезии.

Материалы и методы. Объектами исследований служили молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Pediococcus*, выделенные из молока, ферментированных молочных продуктов и растительной массы, и бифидобактерии *Bifidobacterium adolescentis.*

Культуры бактерий поддерживали методом субкультивирования на среде MRS, хранили при температуре 4–8 °С. В качестве посевного материала использовали 5 об.% 20 ч культуры.

Биомассу определяли, измеряя оптическую плотность суспензии бактериальной при OD 590 нм после 24 ч роста, выражали в мг сухих клеток на мл среды. Для расчета использовали калибровочную кривую зависимости оптической плотности культуральной жидкости от содержания биомассы. Титруемую кислотность культуральной жидкости определяли титрометрическим методом, результат выражали в градусах Тернера (°Т).

Антагонистическую активность бактерий определяли общепринятыми методами при культивировании в жидких (метод предельных разведений) и агаризованных (метод лунок) питательных средах [12].

Адгезивные свойства бактерий характеризовали, определяя их способность взаимодействовать со специфическими лигандами белковой природы [13], а также по способности формировать биопленки в условиях *in vitro* в лунках полистирольных планшетов [14, 15].

Экспресс-определение адгезивных свойств бактерий [13] основано на характеристике сорбционной способности клеток на специфических белковых лигандах, в качестве которых использовали гемоглобин, желатин, казеин по Гаммерстену, Na-казеинат, коллаген, бычий сывороточный альбумин и глобин бычий. Для подготовки лигандов белки растворяли из расчета 20 мкг/мл в 0,2 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, по 50 мкл вносили в лунки полистирольного планшета, оставляли на 24 ч при 4 °С. Затем промывали тем же буфером, высушивали на воздухе, вносили по 200 мкл бактериальной суспензии с оптической плотностью от 0,5 до 0,6 при $OD_{590\ нм}$. После 15 мин инкубирования по 100 мкл суспензии отбирали, переносили в другую лунку со 100 мкл 0,2 М натрий-фосфатного буфера, перемешивали

и измеряли оптическую плотность полученных разведенных суспензий при $OD_{590\ нм}$. В контрольных вариантах использовали лунки, не содержащие лиганды. Индекс адгезии (%), характеризующий способность микробных клеток взаимодействовать со специфическими лигандами белковой природы, вычисляли по формуле:

$$ИА = 100–100(OD_{590}\ опыт\ /\ OD_{590}\ контроль),$$

где OD_{590} опыт – значение оптической плотности суспензии, отобранной из лунки, содержащей лиганд; $ОП_{590}$ контроль – суспензии из лунки без лиганда.

Микроорганизмы считали неадгезивными при ИА $\leq$1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0; высокоадгезивными – при ИА $\geq$4,0.

Для определения способности молочнокислых бактерий к формированию биопленок по 0,2 мл бактериальных культур вносили в лунки стерильного планшета, инкубировали при 37 °С в течение 24 (48) ч, отбирали содержимое, промывали лунки дистиллированной H_2O. Для окрашивания биопленок в лунки вносили по 150 мкл водного раствора кристаллического фиолетового (1 %), оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Затем краситель удаляли, пятикратно промывали лунки дистиллированной H_2O. Далее в лунки добавляли по 0,2 мл 95%-ного этанола, выдерживали 3 мин при комнатной температуре, отбирали из каждой лунки по 100 мкл содержимого в чистый планшет для измерения $OD_{540\ нм}$ спектрофотометрически. Контролем служил образец без использования бактериальной суспензии, обработанный аналогично опытной пробе. Все исследования проводили в трехкратной повторности, определяли среднее значение:

$$OD_{540\ нм} = среднее\ значение\ OD_{540\ нм}\ штамма – OD_{540\ нм}\ контроля.$$

Согласно принятой градации [14, 15], при $OD_{540\ нм}$ ниже 0,15 адгезия отсутствует, $OD_{540\ нм} \geq 0{,}15$ является показателем способности к адгезии. Для упрощения интерпретации используются также категории «отсутствие адгезии», «слабая адгезия»,

«средняя адгезия» и «интенсивная адгезия» – в зависимости от величины среднего значения $OD_{540\ нм}$ штамма.

Результаты и обсуждение. Критерием для отбора штаммов в состав препарата служили показатели активности роста и кислотообразования, антимикробная эффективность по отношению к условно-патогенным бактериям, относящимся к возбудителям эндометритов. На начальном этапе отобрано 9 культур бактерий рода *Lactobacillus* (3 штамма *L. plantarum*, 3 штамма *Lactobacillus paracasei*, а также по 1 штамму *L. rhamnosus*, *L. fermentum* и *Lactobacillus helveticus*), 1 штамм *Pediococcus pentosaceus* и 7 – *L. lactis*. Бактерии различались по уровню накопления биомассы в среде MRS и особенностям кислотообразования (табл. 1).

Для исследования антагонистической активности отобранных бактерий использовали тест-культуры *S. aureus*, *S. aureus* 1098, *S. saprophyticus*, *E. coli*, а также *S. typhimurium*. Установлено, что у *L. rhamnosus* M8, *L. fermentum* M9, *L. plantarum* HE-2

Таблица 1. **Рост и кислотообразование молочнокислых бактерий**

Штамм	Биомасса ($OD_{590\ нм}$)	pH	Титруемая кислотность (°T)
L. plantarum 087	1,32	5,10	96
L. paracasei 088	1,20	4,62	80
L. rhamnosus M8	1,20	4,18	120
L. fermentum M9	2,34	4,32	128
L. plantarum M10	1,32	4,74	112
L. plantarum HE-2	2,28	4,19	130
P. pentosaceus M7	0,95	4,30	110
L. paracasei M5	2,60	4,26	120
L. helveticus R	2,40	4,26	125
L. paracasei DHE	2,30	4,35	118
L. lactis AB-39	0,84	4,10	94
L. lactis AB-37	0,86	4,10	86
L. lactis AB-32	0,96	4,08	90
L. lactis AB-26	0,92	4,20	92
L. lactis AB-19	0,98	4,80	88
L. lactis AB-11	0,90	4,40	86
L. lactis C3	0,94	4,10	101

Примечание. Показатели после 20 ч культивирования на среде MRS.

и *L. lactis* АВ-32 наиболее выражена антагонистическая активность по отношению к тест-штаммам (рис. 1).

Для данных культур также характерна высокая кислотообразующая активность – к 72 ч роста на среде MRS показатель pH составил 3,63–3,86, титруемая кислотность – от 280 до 310 °Т.

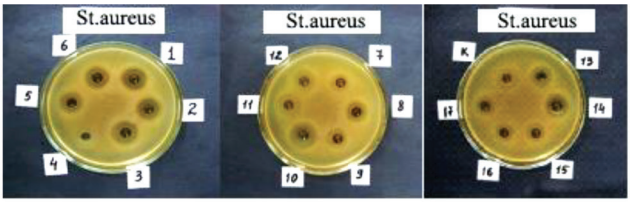
Из смешанных культур отобранных молочнокислых бактерий и бифидобактерий *B. adolescentis* составлены консорциумы № 1–8, исследована их антагонистическая активность по отношению к тест-штаммам условно-патогенных микроорганизмов и изолятам потенциальных возбудителей эндометрита, полученным из экссудата полости матки коров, болеющих послеродовым эндометритом.

Установлено, что все проверенные композиции бактерий проявляют антагонизм по отношению к использованным тест-штаммам бактерий рода *Staphylococcus*, *E. coli* и *S. typhimurium* (рис. 2), а также изолятам из экссудата полости матки коров с послеродовым эндометритом. Зоны угнетения их роста составили от 9,9 до 10,8 мм (рис. 3). Консорциумы, которые включали три штамма лактобацилл, обладали наиболее выраженной активностью во всех вариантах.

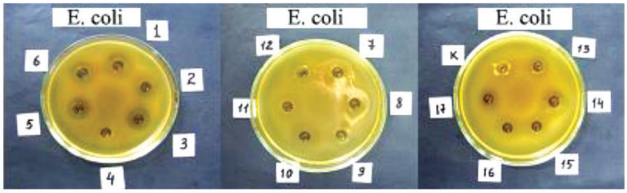
Известно, что стабильность и защитные свойства микробиоты макроорганизма зависят от адгезивных свойств микроорганизмов. Адгезия пробиотиков к эпителию слизистых оболочек и присутствие их в составе биопленки, покрывающей поверхность эпителия, обеспечивает взаимодействие с иммунной системой макроорганизма, оказывая влияние на врожденный и адаптивный иммунный ответ на уровне эпителия, дендритных клеток, моноцитов / макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток.

Адгезивными свойствами характеризуются как представители нормальной микрофлоры, так и патогенные микроорганизмы. Благодаря адгезии резидентная микрофлора реализует свойство колонизационной резистентности, тем самым препятствует заселению биотопов организма-хозяина посторонними микроорганизмами [5–11].

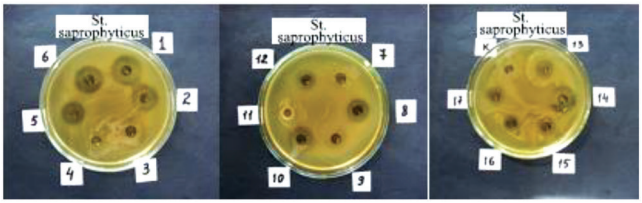
Адгезивные свойства исследуемых бактерий определяли по взаимодействию со специфическими лигандами белковой природы, а также по формированию биопленки в лунках полистирольного планшета.



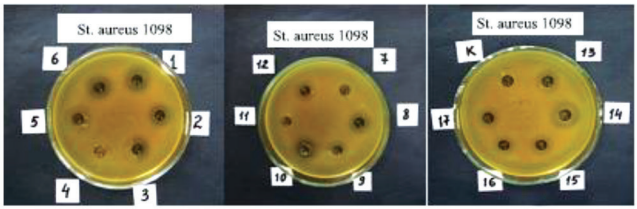
Тест-штамм *S. aureus*



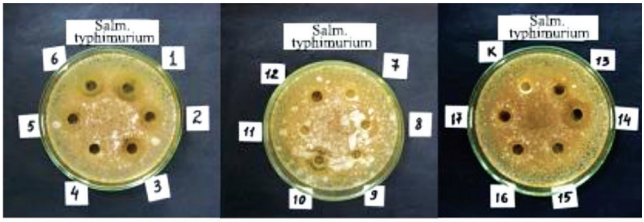
Тест-штамм *E. coli*



Тест-штамм *S. saprophyticus*



Тест-штамм *S. aureus* 1098



Тест-штамм *S. typhimurium*

Рис. 1. Определение антимикробного действия молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенным бактериям методом лунок

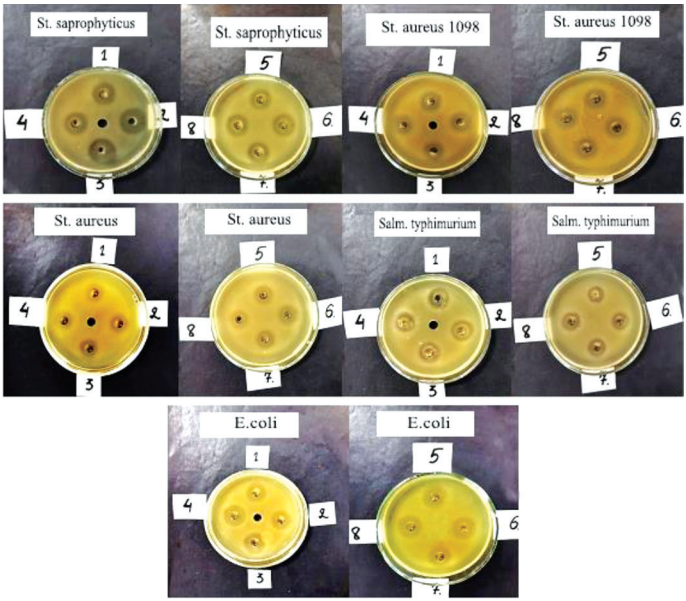


Рис. 2. Антагонистическая активность консорциумов молочнокислых бактерий по отношению к тест-штаммам условно-патогенных бактерий: *1 – L. ramnosus* M8 + *L. fermentum* M9 + *L. lactis* AB-32; *2 – L. ramnosus* M8 + *L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1 + *L. lactis* AB-32; *3 – L. ramnosus* M8 + *L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1 + *L. lactis* AB-32 + *B. adolescentis*; *4 – L. ramnosus* M8 + *L. plantarum* HE1 + *L. lactis* AB-32 + *B. adolescentis*; *5 – L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1; *6 – L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1 + *B. adolescentis*; *7 – L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1 + *L. lactis* AB-32; *8 – L. fermentum* M9 + *L. plantarum* HE1 + *L. lactis* AB-32 + *B. adolescentis*

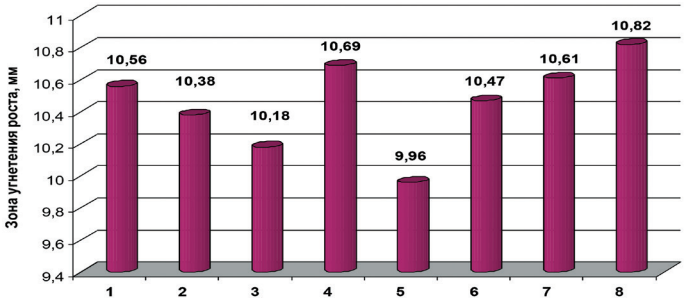


Рис. 3. Размер зон угнетения роста изолятов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из экссудата полости матки коров с послеродовым эндометритом под влиянием консорциумов № 1–8

Таблица 2. **Адгезия молочнокислых бактерий к белковым лигандам**

Культура	Индекс адгезии, %					
	казеин по Гаммерстену	гемоглобин	казеинат Na	желатин	коллаген	глобин бычий
L. rhamnosus M8	0	14,0	0	11,8	6,5	15,3
L. fermentum M9	0	0	2,6	15,6	9,2	0
L. plantarum HE-2	1,8	2,4	6,8	7,7	0	0
L. lactis AB-32	4,5	2,8	8,4	0,9	2,9	1,0

Примечание. ИА ≤ 1,75 – культуры неадгезивные; ИА от 1,76 до 2,5 – низкоадгезивные; ИА от 2,51 до 4,0 – среднеадгезивные; ИА ≥ 4,0 – высокоадгезивные.

Установлено, что по отношению к бычьему сывороточному альбумину нет адгезии ни у одной из проверенных культур МКБ. Наиболее высокий индекс адгезии показан *L. rhamnosus* M8 по отношению к глобину бычьему, гемоглобину и желатину. У штамма *L. lactis* AB-32 наиболее выражена адгезия к казеину (табл. 2).

При исследовании образования биопленок бактерий *in vitro* методом окрашивания кристаллическим фиолетовым в лунках полистирольного планшета показано, что способность к адгезии клеток *L. rhamnosus* M8 и *L. lactis* AB-32 после 24 ч культивирования на стандартной среде характеризуется как «средняя», *L. fermentum* M9 – «слабая», *L. plantarum* HE-2 – «интенсивная». К 48 ч культивирования формирование биопленки у всех штаммов характеризуется как «интенсивное» (табл. 3). Наиболее высокая способность к адгезии отмечена у штамма *L. plantarum* HE-2.

Таблица 3. **Адгезивные свойства молочнокислых бактерий (по методу окрашивания кристаллическим фиолетовым в лунках полистирольного планшета)**

Штамм	$ОП_{540\ нм}$	
	24 ч	48 ч
L. rhamnosus M8	0,176 (среднее)	0,679 (интенсивное)
L. fermentum M9	0,117 (слабое)	0,674 (интенсивное)
L. plantarum HE-2	0,535 (интенсивное)	> 3 (интенсивное)
L. lactis AB-32	0,249 (среднее)	2,151 (интенсивное)

Заключение. Отобраны штаммы молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, выделенные из природных источников, проявляющие антагонизм по отношению к тест-штаммам условно-патогенных микроорганизмов, а также изолятам потенциальных возбудителей эндометрита, полученным из экссудата полости матки коров, болеющих послеродовым эндометритом. Составлен консорциум, включающий молочнокислые бактерии *L. rhamnosus* M8, *L. fermentum* M9, *L. plantarum* HE-2 и *L. lactis* AB-32, для которых характерны стабильный рост, высокая кислотообразующая активность, способность к адгезии, угнетение роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Данная композиция перспективна для использования в профилактике и лечении эндометрита.

Литература

1. Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows / C. Otero [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 31. – P. 251–254.

2. Potential of lactic acid bacteria at regulating *Escherichia coli* infection and inflammation of bovine endometrium / S. Genís [et al.] // Theriogenol. – 2016. – Vol. 85, № 4. – P. 625–637.

3. Гордеева, И. В. Эпизоотологический и микробиологический скрининг болезней репродуктивных органов коров в условиях Среднего Поволжья: микробиоценозы и их коррекция : дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / И. В. Гордеева. – Н. Новгород, 2005. – 198 с.

4. Марцинковская, И. В. Эпизоотологические аспекты эндометритов крупного рогатого скота, оптимизация системы лечебно-профилактических мероприятий с использованием пробиотиков : дис. ... докт. вет. наук : 16.00.03 / И. В. Марцинковская. – СПб., 2008. – 162 с.

5. Precalving intravaginal administration of lactic acid bacteria reduces metritis prevalence and regulates blood neutrophil gene expression after calving in dairy cattle / S. Genís [et al.] // Front Vet. Sci. – 2018. – Vol. 21, № 5. – P. 135.

6. Антимикробная активность и стабильность лактобактерий и созданных на их основе композиций противомаститного препарата для коров / Л. М. Бородич [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2008. – № 3. – С. 92–99.

7. Probiotic properties of vaginal lactic acid bacteria selected for harmonization of microenvironment of reproductive apparatus / Q. Deng [et al.] // J. Anim. Sci. – 2016. – Vol. 94, № 2. – P. 760–770.

8. Effects of lactic acid bacteria on metritis prevalence and endometrium inflammation in dairy cows / S. Genís [et al.] // J. Animal Sci. – 2016. – Vol. 94, suppl. 5 (1 Oct.). – P. 68.

9. Применение пробиотиков в педиатрии: анализ лечебного и профилактического действия с позиций доказательной медицины / Е. А. Корниенко [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – № 9. – С. 52–63.

10. Бухарин, О. В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза / О. В. Бухарин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 1. – С. 83–86.

11. Влияние адгезивной активности бактерий на их количественное содержание в кишечнике у ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова [и др.] // Фундам. исследования. – 2011. – № 7. – С. 61–63.

12. Егоров, Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1965. – 211 с.

13. Способ экспресс-определения адгезивного потенциала микроорганизмов : пат. RU 2537128 C1 : МПК C12Q 1/02(2006.01) G01N 33/50(2006.01) / Д. А. Долбин [и др.]. – Опубл. 27.12.2014.

14. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanovic [et al.] // Apmis. – 2007. – Vol. 115. – P. 891–899.

15. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanovic [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 40. – P. 175–179.

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA PROMISING FOR PREVENTION AND TREATMENT OF UROGENITAL DISEASES

N. A. GOLOVNYOVA[1], M. E. SAFONOVA[1], A. N. MOROZOVA[1], N. E. RYABAYA[1], A. A. SAMARTSEV[1], A. N. MIKHALYUK[2]

[1]Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus, biochem_lab@mbio.bas-net.by
[2]Grodno State Agrarian University, Grodno, Belarus, ggau@ggau.by

Screening of lactic acid bacteria promising for further use in the prevention and treatment of endometritis in cows was conducted. The peculiarities of growth and acid production, antimicrobial activity and adhesive ability of lactic acid bacteria were studied. Bacterial consortium with potential probiotic properties composed of *Lactobacillus rhamnosus* M8, *Lactobacillus fermentum* M9, *Lactobacillus plantarum* NE-2 and *Lactococcus lactis* AB-32 was characterized by stable growth, high acidogenic activity, adhesion to protein ligands, and suppression of pathogenic species *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and microbial isolates from the uterine exudate of cows infected with postpartum endometritis.

Поступила в редакцию 09.06.2020