

Гулнора АБДУЛАХАДОВА,
Институт микробиологии АН РУз, докторант PhD III -курса
E-mail:abdulakhadova.@gmail.com
Тел:+998946576606

Низора ЗУХРИТДИНОВА,
Институт микробиологии АН РУз, старший научный сотрудник, к.б.н.

Комола АЗИМОВА,
Ташкентский фармацевтический институт, ассистент

Под рецензии к.б.н., доцент Д.Т.Тўраева

АНТИБИОТИК ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Аннотация

Из молочных продуктов сузма, сыр, молоко выделены молочнокислые бактерии принадлежащие к видам *L. brevis* 6G, *L. fermentum* 10 G и *L. plantarum* 5G, *P. acidilactici* 1G. Отмечено, что штаммы *L. brevis* 4G и *L. plantarum* 3G чувствительны к антибиотикам группы *Erythromycin* и *Rifampicin* с зоной подавления роста от 30 мм 35 мм. Активное ингибирующее действие оказали штаммы *L.fermentum* 10G, *L.brevis* 4G по отношению к *St.aureus*, *E.coli*, *Pr.mirabilis*, *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis* зоны отсутствия роста у которых варьировала от 28 до 40 мм.

Ключевые слова: Молочнокислые бактерии, антимикробная активность, чувствительность к антибиотикам.

SUT MAHSULOTLARIDAN AJRATIB OLINGAN LACTOBACILLUS AVLODIGA MANSUB BAKTERIYALARNI ANTIBIOTIKKA SEZGIRLIGI VA ANTIMIKROB XUSUSIYATLARI

Annotatsiya

Sut mahsulotlari suzma, pishloq, sutdan *L. brevis* 4G, *L. fermentum* 10 G va *L. plantarum* 5G, *P. acidilactici* 1G turiga mansub sut achituvchi bakteriyalar ajratib olingan. *L. brevis* 4G va *L. plantarum* 3G shtammlari antibiotikka sezuvchanlik zonasi 30 mm dan 35 mm gacha qayd etildi va *Eritromitsin* va *Rifampitsin* guruhlari antibiotiklariga yuqori sezuvchanlik ko'rsatdi. *L.fermentum* 10G, *L.brevis* 4G shtammlari *St.aureus*, *E.coli*, *Pr.mirabilis*, *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis*ga ingibirlash zonalari 28mm dan 40 mm gacha o'zgardi.

Kalit so'zlar: Sut achituvchi bakteriyalar, mikroblarga qarshi faolligi, antibiotiklarga sezuvchanligi.

ANTIBIOTIC SENSITIVITY AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA OF THE GENUS LACTOBACILLUS ISOLATED FROM DAIRY PRODUCTS

Annotation

Lactic acid bacteria belonging to the species *L. brevis* 4G, *L. fermentum* 10 G and *L. plantarum* 5G, *P. acidilactici* 1G were isolated from dairy products suzma, cheese, and milk. It was noted that strains *L. brevis* 4G and *L. plantarum* 3G showed high sensitivity to antibiotics of the *Erythromycin* and *Rifampicin* groups with a growth inhibition zone from 30 mm to 35 mm. The strains *L.fermentum* 10G, *L.brevis* 4G had an active inhibitory effect on *St.aureus*, *E.coli*, *Pr.mirabilis*, *C.albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis*; their zones of no growth varied from 28 to 40 mm .

Key words: Lactic acid bacteria, antimicrobial activity, sensitivity to antibiotics.

Лактобациллы являются одним из наиболее изученных бактерий микробиома человека. Эти преимущества регулируют состав резистентной микробиоты и устраняют дисбиотическое состояние. Молочнокислые культуры можно использовать в качестве альтернативы обычным антибактериальным и противогрибковым веществам с потенциальным применением в фармацевтике, медицине в сельском хозяйстве и пищевой промышленности в качестве природного агента биоконтроля.

Авторами проведены работы по изучению антимикробной активности пробиотических штаммов рода *L. plantarum* в качестве противомикробных препаратов и изучен его терапевтический потенциал [1]. Проведены исследования 135 штаммов вагинальных лактобацилл трех видов: *L. crispatus* (56%), *L. jensenii* (26%) и *L. gasseri* (18%) на их безопасность. В результате штаммы *L. crispatus* (89%) и *L. jensenii* (86%) продуцировали H₂O₂. Штаммы *L. crispatus* показали значительно высокую антагонистическую активность на *E. coli* по сравнению с *L. Jensenii* [2]. Изучены виды молочнокислых бактерий рода *L. crispatus*, в отношении основных патогенов, вызывающих инфекции влагалища и мочевыводящих путей, включая *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Gardnerella vaginalis* и *Proteus mirabilis* [3]. Отобраны 53 изолята лактобацилл из вагинальных мазков, которые были идентифицированы с помощью биохимических и молекулярных методов. Семь из выделенных лактобацилл явились антагонистами патогенов рода *Gardnerella vaginalis* [4]. Исследованы пробиотические свойства семи штаммов, *L.rhamnosus*, *L. helveticus* и *L.salivarius*. Эти культуры использовались в новых функциональных препаратах как для желудочно-кишечного, так и для вагинального зубиоза [5]. На основании секвенирования гена 16s рНК идентифицированы изоляты *L. brevis* LB32 и *L. pentosus* LP05. 2 изолята ингибировали рост *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumonia*. Штамм *L. brevis* LB32 снижал уровень холестерина на 86% по сравнению с *L. pentosus* LP05, который показал снижение только на 69% [6]. Выявлены антагонистические свойства *L. salivarius* и *L. fermentum* на пародонтальные патогены, включая *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* и *Porphyromonas gingivalis in vitro*. Штаммы значительно ингибировали рост *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* и *Porphyromonas gingivalis* [7]. Показан синтез противогрибковых метаболитов у *Lactobacillus spp* таких как жирные и оксигирные кислоты с потенциальной антагонистической активностью. Бактерии продуцировали высокую концентрацию фенилмолочной кислоты в присутствии галактозилполиолов (до 84,3 мг/л) [8].

В данной работе изучены антимикробные действия молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* и *Pediococcus* выделенных из молочных продуктов на некоторые условно патогенные бактерии.

Методы исследования. Выделение молочнокислых бактерий осуществляли из молочнокислых продуктов сузма, сыр, молоко, брынза. Культивирование лактобацилл проводили на селективной питательной среде для лактобацилл MRS (Hi-media, Индия) при 37-40⁰С в аэробных и анаэробных условиях в течение 24-48 часов. Для создания анаэробных условий использовали анаэрошат (Schnett-biotech GmbH, Германия). Морфолого культуральные и физиолого-биохимические свойства изучались по в «Определителю Берджи» [9, 10]. Идентификация выделенных штаммов проводилась на масспектрофотометре MALDI-TOF [11].

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Для определения чувствительности штаммов лактобактерий к антибиотикам, отбирали препараты наиболее часто применяемые в профилактике и лечении ряда заболеваний желудочно-кишечного тракта. Использовали диско-диффузионный метод, описанный в методическом указании МУК 4.2. 1890-04. Исследуемые штаммы лактобактерий выращивали в MRS-бульоне в течение 24 часов при 37⁰С. Титр клеток доводили до 10⁷ КОЕ/мл и с помощью палочки с ватным тампоном рассеивали на поверхность MRS -агара. Затем диски с антибиотиками (Hi-Media, Индия) размещали на поверхность засеянной среды. Чашки инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов. Чувствительность лактобактерий к антибиотикам оценивали по зонам задержки роста вокруг дисков. Анализ проводили в трехкратной повторности.

Определение антимикробной активности. Антагонистические свойства изолятов против патогенов в условиях *in vitro* анализировали методом пятен на агаре [12]. Для этого суточные культуры лактобацилл, выращенные на MRS-бульоне высевали отдельными пятнами 6 мкл на поверхность чашки с MRS агаром и инкубировали при 37⁰С в течении 48 часов в анаэробных условиях. Затем чашки покрывали вторым слоем 8 мл мягкого МПБ агара, содержащего индикаторные бактерии в количестве 10⁶ КОЕ/мл в стационарной фазе. После культивирования при 37⁰С в термостате, наблюдали появления зоны подавления индикаторном слое. Опыты проводили в 2-х повторностях.

Результаты исследований. Всего выделено 40 изолятов молочнокислых бактерий. Из них 6 штаммов отобраны для исследований и идентифицированы до вида (1-таблица).

Таблица 1

№	Наименование штамма	Образцы
1	<i>L. brevis</i> 4G	сузма
2	<i>L. fermentum</i> 10G	сыр
3	<i>L. paracasei</i> 8G	молоко
4	<i>L. plantarum</i> 5G	творог
5	<i>P. acidilactici</i> 1G	брынза
6	<i>P. acidilactici</i> 2G	молоко

Известно, что лечебное действие антибиотиков сводится к совместным действием антибиотика на организм человека. При применении антибиотика в больших дозах они оказывают и бактерицидное действие.

Нами были проведены исследования по определению устойчивости выделенных штаммов молочнокислых бактерий к различным наиболее распространённым антибиотикам.

Выделенные нами молочнокислые бактерии проявляли чувствительность к 8: *Amikacin*, *Erythromycin*, *Gentamicin*, *Azithromycin*, *Tetracycline*, *Rifampicin*, *Ampicilin*, *Ciprofloxacin* испытанным антибиотикам. На рисунках приведены результаты по изучению чувствительности молочнокислых культур к 8 антибиотикам. Из данных рисунка 1 видно, что изученные штаммы *L. brevis* 4G и *L. plantarum* 3G культуры показали высокую чувствительность к антибиотикам группы *Erythromycin* и *Rifampicin* с зоной подавления роста 35 мм и 30 мм соответственно. При этом штаммы вида *L. fermentum* 10G, *L. paracasei* 8G, *L. plantarum* 3G, проявляли значительную чувствительность к антибиотикам ципрофлоксацину и ампициллину.

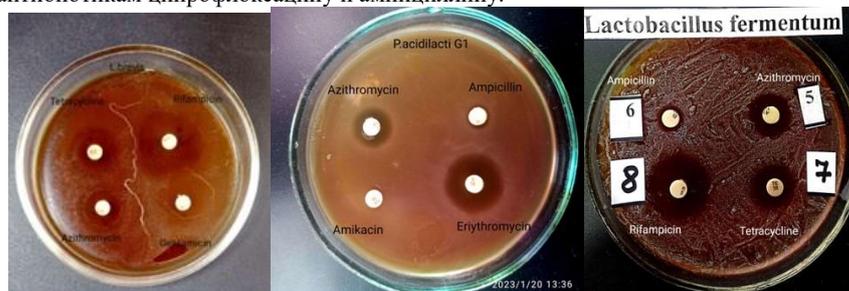


Рисунок 1. – Чувствительность лактобактерий к антибиотикам

Сравнительно меньше значения отмечены к гентамицину, азитромицину, амикацину, тетрациклину (2-таблица).

Таблица 2

Антибиотики		Штаммы					
		<i>L. brevis</i> 4G	<i>L. fermentum</i> 10G	<i>L. plantarum</i> 3G	<i>L. paracasei</i> 8G	<i>P. acidilacti</i> 1G	<i>P. acidilacti</i> 2G
Концентрация в диске, мкг		Диаметр зон ингибирования роста, мм					
Amikacin	30	15	14	8	0	0	18
Erythromycin	15	30	25	25	25	25	30
Gentamicin	10	15	0	10	0	10	15
Azithromycin	15	16	18	8	12	15	20
Tetracycline	30	18	16	15	10	15	20
Rifampicin	5	35	25	30	20	20	35
Ampicilin	10	18	12	18	20	0	0
Ciprofloxacin	5	16	0	18	14	0	10

Антимикробная активность МКБ на широкий спектр патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проявляется действием продуцируемых в процессе развития органических кислот, перекисей и других метаболитов. В связи этим проведено изучение молочнокислых бактерий по отношению к *Aeromonas Veronii*, *Listeria Monocytogenis*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter trydo*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Enterococcus faecalis*

Приведенные табличные данные показывают, что интенсивность воздействия (ширина зоны ингибирования роста вокруг патогенов) варьировала в зависимости от вида тест культур. Так, штаммы *L. fermentum 10G*, *L. brevis 4G* проявили наибольший антагонистический эффект по отношению *St. aureus*, *E. coli*, *Pr. mirabilis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* зоны отсутствия роста у которых варьировала от 28 до 40 мм. Штаммы вида *P. acidilacti* активное действие оказали на культуры *L. monocytogenis*, *E. coli*, *Ps. aerogenosa*, *C. albicans* где зона отсутствия роста составила в пределах от 12мм до 40 мм. Сравнительно ниже антагонистическая активность к тест культурам проявилась у *L. paracasei 8G*, *L. plantarum 3G*.

Таблица 1

Антимикробная активность молочнокислых бактерий

Патогены	Штаммы					
	<i>L. fermentum 10G</i>	<i>L. plantarum 3G</i>	<i>L. paracasei 8G</i>	<i>L. brevis 4G</i>	<i>P. acidilacti 1G</i>	<i>P. acidilacti 2G</i>
	Диаметр зон ингибирования роста, мм					
<i>A. veronii</i>	0	10±0,3	18±0,2	10±0,3	14±0,9	15±0,2
<i>L. Monocytogenis</i>	0	12±0,4	0	14±0,4	0	30±0,1
<i>St. aureus</i>	30±0,6	26±0,4	18±0,6	36±0,9	11±0,9	30±0,8
<i>C. trydo</i>	0	0	0	12±0,8	18±0,4	32±0,6
<i>B. subtilis</i>	10±0,8	23±0,5	20±0,3	30±0,4	16±0,3	10±0,9
<i>E. coli</i>	30±0,3	23±0,3	20±0,6	28±0,1	30±0,7	26±0,8
<i>Ps. aerogenosa</i>	10±0,3	20±0,1	17±0,9	0	30±0,9	25±0,3
<i>Pr. mirabilis</i>	30±0,9	24±0,1	0	26±0,9	14±0,2	12±0,5
<i>Kl. oxytoca</i>	24±0,2	20±0,3	12±0,3	0	12±0,3	0
<i>C. albicans</i>	32±0,1	38±0,9	20±0,4	40±0,6	30±0,1	40±0,7
<i>C. krusei</i>	30±0,7	34±0,5	25±0,3	30±0,9	25±0,8	25±0,9
<i>C. tropicalis</i>	35±0,2	35±0,1	10±0,5	25±0,3	18±0,7	25±0,2

Проведенные исследования на антимикробную активность выделенных штаммов показывают, что штаммы *L. fermentum 10G*, *Lactobacillus brevis 4G*, *P. acidilacti 1G*, *P. acidilacti 2G* обладают выраженным антагонистическими свойствами и их можно будет применять для профилактики и лечения бактериальных и грибковых инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maria Teresa Rocchetti, Pasquale Russo, Vittorio Capozzi, Djamel Drider, Giuseppe Spano, and Daniela FioccoInt J Bioprospecting Antimicrobials from Lactiplantibacillus plantarum: Key Factors Underlying Its Probiotic Action Mol Sci. 2021 Nov; 22(21): 12076.
2. Hütt P, Lapp E, Štěpetova J, Smidt I, Taelma H, Borovkova N, Oopkaup H, Ahelik A, Rööp T, Hoidmets D, Samuel K, Salumets A, Mändar R. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. Microb Ecol Health Dis. 2016 Aug 12;27:30484.
3. Siroli L, Patrignani F, Serrazanetti DI, Parolin C, Nahui Palomino RA, Vitali B, Lanciotti R. Determination of Antibacterial and Technological Properties of Vaginal Lactobacilli for Their Potential Application in Dairy Products. Front Microbiol. 2017 Feb 7;8:166.
4. Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, Chihib NE, Drider D. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. Microb Ecol. 2014 Apr;67(3):722-34.
5. Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. Sci Rep. 2019 Mar 4;9(1):3355.
6. Mojgani N, Hussaini F, Vaseji N, Jundishapur J. Characterization of indigenous lactobacillus strains for probiotic properties. Microbiol. 2015 Feb 7;8(2):e17523
7. Ling-Ju Chen, Hsiu-Ting Tsai, Wei-Jen Chen, Chu-Yang Hsieh, Pi-Chieh Wang, Chung-Shih Chen, Lina Wang, Chi-Chiang Yang. In vitro antagonistic growth effects of *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus salivarius* and their fermentative broth on periodontal pathogens. Braz J Microbiol 2012 Oct;43(4):1376-84.
8. Lipinska-Zubrycka L, Klewicki R, Sojka M, Bonikowski R, Milczarek A, Klewicka. Anticandidal activity of *Lactobacillus* spp. in the presence of galactosyl polyols. E. Microbiol Res. 2020 Nov;240:126540.
9. Определитель бактерий Берджи /Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. М.: Мир.-1997. -Т.1.-С.185.
10. Стоянова Л.Г. Молочнокислые бактерии // Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. С. 467–486. 26. Нетрусов А.И. Большой практикум по микробиологии. М., 2005. 603 с.
11. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия — новое слово в клинической микробиологии и клинической лабораторной диагностике. 2016; 61(12)
12. Da Cunha L.R., Fortes Ferreira C.L.L., Durmaz E., Goh Y.L., Sanozky- Dawes R.B. Klaenhammer T.R. Characterization of *Lactobacillus gasseri* isolates from a breast-fed infant // Gut Microbes -2012-v.3.- №1-P.15-24.