

**ВЛИЯНИЕ ЛАКТИТА И ЛАКТУЛОЗЫ НА АДГЕЗИВНЫЕ
СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS***

*Изучены адгезивные свойства пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140. Показано, что штамм *Bacillus subtilis* УКМ 5139 является неадгезивным, а штамм *Bacillus subtilis* УКМ 5140 - слабоадгезивным. Лактит и лактулоза не влияли на адгезивные свойства пробиотических штаммов бацилл, но снижали эти показатели условно патогенных микроорганизмов.*

*Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, адгезивные свойства, пребиотики.*

Пробиотические препараты на основе аэробных спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* широко используются для коррекции дисбиотических состояний. Антагонизм в отношении широкого круга патогенных и условно патогенных микроорганизмов, а также самостоятельная элиминация из желудочно-кишечного тракта, стимулирующее влияние на пищеварение, противоаллергенное, антитоксическое, saniрующее и общеукрепляющее воздействие на организм, сделали их особенно перспективными при создании пробиотических препаратов.

Наряду с высокими антагонистическими свойствами пробиотических штаммов, особого внимания заслуживают их адгезивные свойства, исследования которых являются необходимым этапом при создании синбиотических препаратов [2, 3, 5].

Адгезия микроорганизмов – первый этап их взаимодействия с макроорганизмом и один из наиболее важных факторов, с помощью которых микрофлора способна колонизировать различные биотопы макроорганизма. От адгезивных свойств микроорганизмов во многом зависит состав, стабильность и защитные свойства биопленки кишечника, которая создает экологический барьер для инфекционных агентов [7, 8, 9]. Высокие адгезивные свойства представителей нормофлоры позволяют занимать им наиболее выгодные экологические ниши, которые обеспечивают их доступными источниками питания, защищают от конкуренции с другими микроорганизмами, предупреждают элиминацию из кишечника в результате перистальтики. В то же время, адгезия условно патогенных микроорганизмов к эпителию кишечника является важным этапом в развитии большинства инфекционных заболеваний.

Цель настоящей работы – оценить влияние лактита и лактулозы на адгезивные свойства пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, перспективных для создания новых синбиотических препаратов.

Материалы и методы. Объектами исследования были пробиотические штаммы *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, входящие в состав препарата эндоспорин, предназначенного для лечения и профилактики дисбиозов желудочно-кишечного тракта животных и человека. Для оценки влияния лактита и лактулозы на адгезивные свойства тест-культур условно патогенных микроорганизмов использовали штаммы *Staphylococcus aureus* УКМ В-4001, *Escherichia coli* УКМ В-930, *Candida albicans* УКМ Y-690.

Адгезивные свойства бактерий изучали с использованием эритроцитов крови человека 0/1 Rh(+) – группы, несущие на своей поверхности гликоферин – вещество, идентичное гликокаликсу эпителиальных клеток [1].

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали по методу В.И. Брилис и соавт. [1] по следующим показателям: среднему показателю адгезии (СПА), т.е. среднему количеству микроорганизмов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита при подсчете не менее 25 эритроцитов, учитывая не более пяти из них в одном поле зрения; коэффициенту участия эритроцитов (КУЭ), т.е. проценту эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микроорганизмы; по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ) – среднему количеству микробных клеток на эритроците, учитывая только участвующие в адгезивном процессе эритроциты. Определяли ИАМ на основании значений СПА и КУЭ: $ИАМ = (СПА * 100) / КУЭ$ [1].

Микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ \leq 1,75, низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5, среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0, высокоадгезивными – при ИАМ $>$ 4,00 [1]. Мазки эритроцитов с адгезированными на них микроорганизмами окрашивали по Романовскому–Гимза. Для соблюдения стандартных условий в постановке опыта использовали эритроциты только одного донора. При изучении влияния лактита и лактулозы на адгезивные свойства микроорганизмов, исследуемые вещества вносили в реакционную смесь в концентрациях 2,5 и 5 %.

Эксперименты проводили в трех повторностях, в качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента на 5 % уровне значимости.

Результаты и их обсуждение. В результате изучения адгезии пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на эритроцитах крови человека показано, что изучаемые штаммы бацилл имели различные адгезивные свойства. Так, культуры штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 обладали ИАМ, равным 1,56 \pm 0,03 и 3,0 \pm 0,01 (табл. 1). Штамм *B. subtilis* УКМ 5140 обладал несколько более высокими показателями СПА и КУЭ, чем *B. subtilis* УКМ 5139. Согласно классификации Брилис [1] штамм *B. subtilis* УКМ 5139 является неадгезивным (ИАМ 1,56 $<$ 1,75), а штамм *B. subtilis* УКМ 5140 – слабоадгезивным (ИАМ 3,0 $>$ 4,0). Такие низкие показатели адгезивности исследуемых пробиотических штаммов возможно связаны с ингибирующим эффектом продуцируемых ими же антибиотиков [3].

Таблица 1

Показатели адгезивной активности штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на модели эритроцитов крови человека в присутствии лактита и лактулозы

Штамм бацилл	Показатели адгезивности	Изменение адгезивных свойств бацилл в присутствии пребиотических веществ				
		Контроль (без пребиотиков)	Лактит, %		Лактулоза, %	
			2,5	5,0	2,5	5,0
<i>B. subtilis</i> УКМ 5139	СПА	1,28 \pm 0,01	1,28 \pm 0,01	1,4 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	3,12 \pm 0,02
	КУЭ	72 \pm 4	64 \pm 3	80 \pm 3	92 \pm 3	88 \pm 4
	ИАМ	1,56 \pm 0,04	2,0 \pm 0,02	2,1 \pm 0,2	3,26 \pm 0,03	3,55 \pm 0,03
<i>B. subtilis</i> УКМ 5140	СПА	2,16 \pm 0,01	1,48 \pm 0,03	2,08 \pm 0,01	1,49 \pm 0,02	2,18 \pm 0,01
	КУЭ	72 \pm 3	68 \pm 3	80 \pm 2	71 \pm 4	82 \pm 2
	ИАМ	3,0 \pm 0,01	2,18 \pm 0,003	2,6 \pm 0,01	2,19 \pm 0,001	2,65 \pm 0,04

Представлялось важным проверить, как будут изменяться адгезивные свойства обоих штаммов в смешанной культуре. Анализируя результаты, представленные в табл. 2, можно сделать вывод о том, что адгезивные свойства пробиотических штаммов в совместной культуре (1:1) несколько отличались от таковых в монокультуре. Так показатель СПА для смешанной культуры (1,65 \pm 0,03) был на 23,6 % меньше, чем соответствующие показатели штамма *B. subtilis* УКМ 5140, но на 47,3 % больше для *B. subtilis* УКМ 5139. Несмотря на изменения адгезивных свойств штаммов в смешанной культуре, она оставалась низкоадгезивной, что характерно для исследуемых штаммов бацилл.

Нами было изучено влияние пребиотиков лактита и лактулозы, которые будут входить в состав создаваемого синбиотика, на адгезивные свойства каждого из штаммов. Как видно из данных, представленных в табл. 1, показатели ИАМ для штамма *B. subtilis* УКМ 5139 в присутствии лактита составляли от 2,0 \pm 0,02 до 2,1 \pm 0,2, что было выше на 28,2–34,6 % показателей, полученных без него. Влияние лактулозы на адгезию этого же штамма было еще более заметным: ИАМ в присутствии лактулозы был в 2,0–2,3 раза выше, чем без нее. В противоположность штамму *B. subtilis* УКМ 5139, штамм *B. subtilis* УКМ 5140 под влиянием лактита и лактулозы снижал свою адгезивную способность к эритроцитам на 12–27 % в зависимости от концентрации этих веществ. Однако, несмотря на изменения адгезивных свойств штаммов под действием пребиотических веществ, они оставались низкоадгезивными. Полученные результаты по изучению адгезии изучаемых штаммов аэробных спорообразующих бактерий согласуются с данными литературы [5, 6, 10]. Можно предположить, что адгезивные свойства

тва исследуемых пробиотических штаммов бацилл не имеют характера лиганд-рецепторного взаимодействия, определяющего адгезию микроорганизмов кишечника и способствуют умеренной адгезивности [4].

Таблица 2

Показатели адгезивной активности пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 в смешанной культуре (в соотношении 1:1) на модели эритроцитов крови человека в присутствии лактита и лактулозы

Показатели адгезивности	Изменение адгезивных свойств бацилл в присутствии пребиотических веществ				
	<i>B. subtilis</i> УКМ 5139 + <i>B. subtilis</i> УКМ 5140				
	Контроль (без пребиотиков)	Лактит, %		Лактулоза, %	
2,5		5,0	2,5	5,0	
СПА	1,65±0,03	1,52±0,01	1,75±0,1	2,25±0,1	2,52±0,02
КУЭ	72±4	66±3	80±3	82±3	84±4
ИАМ	2,2±0,04	2,12±0,02	2,3±0,2	3,26±0,03	3,0±0,03

Адгезия условно патогенных микроорганизмов является первым этапом в патогенезе инфекционных заболеваний, а ее ингибирование – непременным условием предотвращения развития болезни на ранней стадии. Впрочем, адгезия представляет интерес не только как пусковой этап патогенеза, но и как фактор, влияющий на персистенцию микроорганизмов в организме хозяина. Поэтому нами было изучено влияние лактита и лактулозы на адгезивные свойства условно патогенных микроорганизмов.

В результате проведенных исследований показана высокая степень адгезивности у исследуемых штаммов *S. aureus* (ИАМ 14,68) и *E. coli* (ИАМ 8,32), у *C. albicans* адгезии не зарегистрировано (рис.). Под влиянием лактита и лактулозы степень адгезивности условно патогенных микроорганизмов резко снижалась: *S. aureus* – от 3,3 до 5,4 раза в зависимости от их концентрации в среде, а штамм кишечной палочки утрачивал адгезивные свойства.

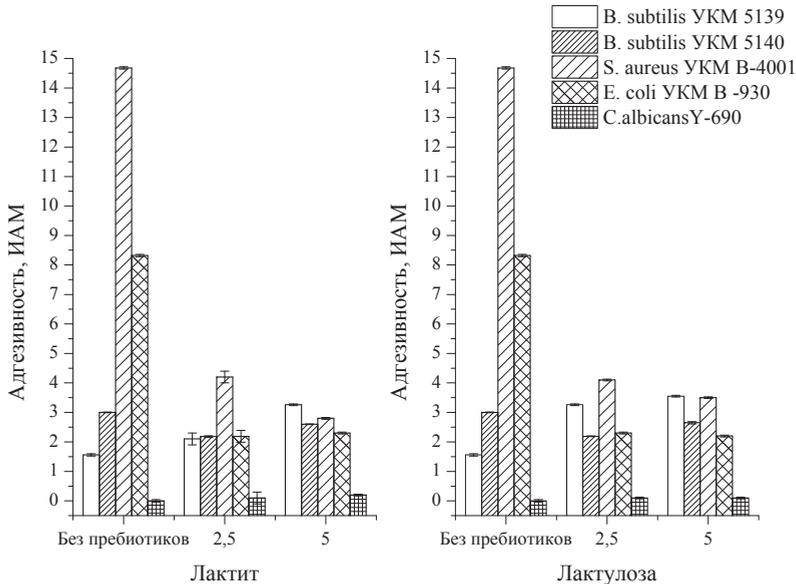


Рисунок. Влияние пребиотиков лактита и лактулозы на адгезивные свойства микроорганизмов.

Таким образом, и лактит, и лактулоза, снижая адгезивные способности условно патогенных микроорганизмов, и тем самым уменьшая время персистенции последних, способствовали более быстрой их элиминации из макроорганизма.

Полученные данные расширяют представления о влиянии пребиотических веществ на адгезивные свойства пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 и условно патогенных микроорганизмов.

ВПЛИВ ЛАКТИТУ ТА ЛАКТУЛОЗИ НА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS*

Резюме

Вивчені адгезивні властивості пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* УКМ 5139 і *Bacillus subtilis* УКМ 5140. Показано, що штам *Bacillus subtilis* УКМ 5139 є неадгезивним, а штам *Bacillus subtilis* УКМ 5140 – середньоадгезивним. Лактит та лактулоза не впливали на адгезивні властивості бацил, але знижували ці показники умовно патогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, адгезивні властивості, пребіотики

L. V. Avdeeva, A. I. Osadchaya, M. A. Kharkhota

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INFLUENCE OF LACTITOL AND LACTULOSE ON ADHESION PROPERTIES OF *BACILLUS SUBTILIS* PROBIOTIC STRAINS

Summary

Adhesion properties of probiotic strains *Bacillus subtilis* UKM 5139 and *Bacillus subtilis* UKM 5140 is studied. It is shown that the strain *Bacillus subtilis* UKM 5139 is nonadhesive, and the strain *Bacillus subtilis* UKM 5140 is subadhesive. Lactitol and lactulose did not influence the adhesive properties of probiotic strains of bacilli, and reduced these properties of conditionally pathogenic microorganisms.

The paper is presented in Russian.

Key words: *Bacillus subtilis*, adhesion properties, prebiotics.

The authors' address: Avdeeva L.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Брилис В.И., Брилене Т. А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А. А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – №4. – С. 210–212.
2. Брилис В.И. Изучение силы цитoadгезии лактобацилл // Успехи в области изучения и производства антибиотиков. – 1990. – №19. – С. 103–105.
3. Осипова И.Г. Некоторые аспекты механизма защитного действия колибактерина и споровых эубиотиков и новые методы их контроля: Автореферат дис. ... канд. биол. наук. – М., 1997. – 25 с.
4. Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* // Микробиологический журнал. – 1993. – 53, №4. – С. 92–112.
5. Смирнов В.В., Косюк І.В. Адгезивні властивості бактерій роду *Bacillus* – компонентів пробіотика // Микробиологічний журнал. – 1997. – 59 №6. – С. 36–43.
6. Царукьянова И.Г., Смирнова Е.В. Изучение адгезивных свойств бактерий, перспективных для создания комплексного пробиотического препарата // Микробиологический журнал. – 2005. – 67, №2. – С. 88–95.
7. Янковский Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека // Здоровье женщины. – 2003. – №4 (16). – С. 145–158.
8. Gibson G. R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // G. Nutr. – 1995. – 125. – P. 140–1412.
9. Guntunen M.K., Kirjavainen P.V. Ouwehand A. C. Adherence of probiotic, bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2001. – 8. N 2. – P. 293–296.
10. Londod G. Identifying and isolating fimbrial association adhesion of oral gramnegative bacteria // Meth. Enzymol. – 1995. – 253. – P. 397–403.

Отримано 18.05.2011