

Изучение антагонистической активности гемолитических *E.coli*, выделенных от больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

(Рецензирована)

Аннотация:

Изучена антагонистическая активность гемолитических эшерихий (*E. coli* Н₂У⁺), выделенных при заболеваниях ЖКТ в отношении близкородственных и неродственных микроорганизмов и её связь с наличием ферментативной активности. Выявлено низкое антагонистическое действие бактериоцинов изучаемых штаммов по отношению к БТП «Колибактерин» и к типичным *E.coli*, и высокое – к условно-патогенным и патогенным энтеробактериям, лактобактериям, золотистому стафилококку. Из трех групп *E.coli* Н₂У⁺ наибольшую антагонистическую активность на изученные индикаторные группы, проявляют штаммы со слабовыраженной ферментативной активностью, наименьшую – лактозонегативные.

Ключевые слова:

Антагонистическая активность, гемолитические, типичные эшерихии, пробиотики, лактобактерии, энтеробактерии.

Введение

При исследовании кишечной микрофлоры больных, страдающих хроническими кишечными заболеваниями, такими как гастрит, холецистит, панкреатит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, был выявлен дисбактериоз, выражающийся в резком повышении содержания бактерий рода протей, наличии гемолитических стафилококков и их ассоциаций, гемолитических кишечных палочек, увеличение числа спорных анаэробных бактерий [5, 6]. Дисбактериоз кишечника может стать причиной, поддерживающей воспалительный процесс при сопутствующих заболеваниях. Отмечено обнаружение гемолитических эшерихий – до 43,6 [9] при полипозах толстой кишки и до 3,4% у больных ЯБЖ и ЯБДК из биоптатов [3]. Существует корреляция между факторами вирулентности и продукцией бактериоцинов [4].

В нашей работе мы изучили наличие антагонистической активности гемолитических эшерихий (Н₂У⁺), выделенных при заболеваниях ЖКТ в отношении близкородственных и не-

родственных микроорганизмов и проследили её связь с наличием ферментативной активности.

Материалы и методы. Изучение микробного биоценоза на основании изучения просветной микрофлоры, согласно методике бактериологического исследования испражнений, предусматривало выделение, количественную и качественную характеристику основных представителей облигатных и факультативно-анаэробных бактерий толстой кишки. Оценку полученных результатов проводили в соответствии с методическими рекомендациями по бактериологической диагностике дисбактериоза [7]. Антагонистическую активность гемолитических *E.coli* определяли методом отстроченного антагонизма [1,8]. На плотную питательную среду (1,5% питательный агар) засекали суточную бульонную культуру штамма – продуцента факторов ингибирования (гемолитические *E.coli*) в виде прямой полосы в центре чашки Петри. После выращивания в течение 24 часов при 37°C и 24 часов при комнатной температуре 24°C, штрихами, перпендикулярно штамму – продуценту проводили высеивание 4-х часовых бульонных (при использовании лакто-

бактерий – суточных агаровых) культур индикаторных штаммов. Через 24-48 часов культивирования при оптимальной для испытуемых культур температуре и условий (микроаэрофильных для лактобактерий) культивирования учитывали расстояние задержки роста индикаторных штаммов. Для контрольного посева вместо индикаторного штамма использовалась изучаемая культура гемолитической *E.coli*. Таким образом создавались оптимальные условия отдельно для роста штамма- продуцента, биосинтеза факторов антагонизма и роста индикаторной культуры, которые могут существенно различаться [2]. Результат оценивался по торможению роста индикаторных штаммов, чувствительных к антагонистическому действию: до 2мм – +, от 2 до 5 мм – ++, 5-10 мм – +++, более 10 мм – ++++.

В качестве индикаторных штаммов использовались культуры патогенных энтеробактерий: *E.coli* O-151, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* 2a; культуры условно-патогенных бактерий: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, типичные *E.coli* и лактобактерии, выделенные от больных дисбактериозом; культуры пробиотиков: *E.coli* M-17 из биотерапевтического препарата (БПТ) «Колибактерин». Выделенные микроорганизмы подвергали идентификации по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам. К лактобациллам относили грамположительные, неподвижные, неспоровые, не обладающие каталазой микроаэрофильные бактерии.

В работу были взяты 105 штаммов гемолитической *E.coli*, выделенных от больных ЖКБ, панкреатитом, холециститом, колитом, ЯБЖ и ЯБДК. Из них 48 штаммов проявляли хорошую, 45 штаммов были со слабовыраженной и 12 штаммов не обладали ферментативной активностью по отношению к лактозе.

Результаты. Все индикаторные штаммы были подразделены на группы [таб. 1]:

1. Группа патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, куда вошли *E.coli* O-151, *S. enteritidis*, *S. flexneri* 2a, *K. pneumoniae*. С этой группой было проведено 408 исследований, в 216 случаях индикаторные штаммы проявляли чувствительность к антагонистическому действию дисбактериозной *E.coli* НУ+ – 59,9 ±

2,5% (M±m), подавление роста в этой группе составило 8,4±0,8 мм.

2. Вторая группа представлена БТП *E.coli* M-17, из 105 проведенных исследований, антагонистическая активность проявилась в 9 случаях – 8,6±2,8%, подавление роста составило 0,9±0,5 мм.

3. С третьей группой – *P. aeruginosa*, проведено 105 исследований, в 51 случае 48,6±4,9% штаммов гемолитической *E.coli* проявили антагонистическую активность с зоной подавления 3,7±0,9 мм.

4. Четвертая группа была представленная кокковыми микроорганизмами- *Staphylococcus aureus*. Из 105 штаммов гемолитической *E.coli*, 81 штамм обладал бактериоцидной активностью- 77,1±4,1%, с зонной задержки роста 7,6±0,9%.

5. Из 1680 исследований – в 636 случаях типичные *E.coli* (пятая группа) были чувствительными к антагонистическому действию *E.coli* НУ+, что составило 37,8±1,2%, зона задержки роста составила 10,8±0,5мм.

6.Группа, представленная бактериями рода *Lactobacillus*. Из 1482 исследований в 853 случаях *E. coli* НУ+проявляли антагонистическое действие, что составило 57,5±1,9% с зоной задержки роста 17,7±0,8мм.

Для изучения влияния лактозного признака на антагонистическую активность штамма-продуцента все *E.coli* НУ+ были разбиты на 3 группы [таб. 3]. Было обнаружено, что наибольшей активностью обладают штаммы со слабовыраженной ферментативной активностью. Так, *E.coli* O-151 была чувствительна к таким штаммам в 80,0±6,0%; *S. enteritidis* в 66,7±7,0%; *S. flexneri* 2a в 26,7±6,6%; *K. pneumoniae* – в 100%, лактобактерии в 68,8±1,8%, типичные *E.coli* – в 48,9±3,3% случаев. Наибольшая антагонистическая активность гемолитических *E.coli* со слабовыраженной ферментативной активностью проявилась в отношении *K. pneumoniae*. Штаммы *E.coli* O-151 оказались более чувствительными к бактериоцинному действию слабоферментирующих *E.coli* НУ+, чем *S. enteritidis* в 1,2 раза ($p>0,1$). Лактобактерии оказались в 1,4 раза более чувствительными, чем типичные кишечные палочки ($n>30$, $p<0,001$).

Активность гемолитической *E.coli* с выраженной ферментативной активностью была не-

сколько ниже. Так, в 93,8±3,4% случаев *E.coli* Hly+ проявляли активность в отношении *K. pneumoniae*, в 68,8±6,7% к *E.coli* O-151, в 56,2±7,2% к *S. enteritidis*, в 39,6±3,2% к типичным *E.coli*, в 28,3±2,0% к лактобактериям и только в 6,2±3,4% к *S. flexneri*. Прослеживается достоверная разница антагонистического действия по отношению к *S. flexneri* группы *E.coli* Hly+ с ферментативной активностью и группы *E.coli* Hly+ со слабовыраженной ферментативной активностью в пользу последних ($p \leq 0,01$). В 75,0±12,5% случаев штаммы лактозонегативных *E.coli* Hly+ проявляют антагонистическую активность к *K. pneumoniae* и в 82,0±2,2% случаев к лактобактериям. К *E.coli* O-151 и *S. enteritidis*: такая активность была в 50,0±14,4%, к типичным *E.coli* в 25,0±5,6%, а к *S. flexneri* – ни одного случая.

При сравнении антагонистического действия 3 групп *E.coli* Hly+ на представителей семейства энтеробактерий в показателях задержки роста (в мм) [таб.2], обнаружено, что наибольшая зона задержки роста прослеживается у *K. pneumoniae*. К слабоферментирующим штаммам *E.coli* Hly+ подавление роста клецелл составляет 20,3±1,1 мм, к штаммам с выраженной ферментативной активностью – 18,6±1,4 мм, и наименьшая – к лактозонегативным *E.coli* Hly+ – 10,5±2,4 мм. Наименьшая задержка роста проявляется у *S. flexneri* в этой же последовательности: 1,5±0,5; 0,6±0,2; 0, мм соответственно. Показатель ингибиции роста типичных *E.coli* [таб.4] выше при действии слабоферментирующих *E.coli* Hly+ и с нормальной ферментативной активностью в 2,2 ($p < 0,001$) и в 1,9 раза ($p < 0,001$) соответственно, чем при действии лактозонегативных. Наибольшая задержка роста патогенной *E. coli* обнаружена к действию лактозонегативной *E.coli* Hly+, *S. enteritidis* к действию *E.coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью, а *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, типичных *E.coli* к действию слабоферментирующих *E.coli* Hly+ – 1,5±0,5; 20,3±1,1; 5,1±0,5 мм ($M \pm m$) соответственно. Связь наличия или отсутствия лактозного признака (в нашем случае – слабовыраженная ферментативная активность) с антагонистической активностью и величиной зоны подавления роста *E. coli* Hly+ прослеживается по отношению к *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, типичным *E.coli*. Наибольшие показатели ингибиции рос-

та лактобактерий проявляли лактозонегативные *E.coli* Hly+: 21,4±0,7 мм, что в 1,4 раза больше, чем действие гемолитических эшерихий с выраженной и слабовыраженной ферментативной активностью ($n > 30$, $p < 0,001$).

Обсуждение

Наибольшую чувствительность к антагонистическому действию гемолитических *E.coli* проявили лактобактерии, *S. aureus*, патогенные и условно патогенные энтеробактерии – более 50% штаммов – продуцентов оказали ингибирующее действие. Менее 50% исследованных штаммов *E.coli* Hly+ проявили активность к синегнойной палочке и к типичным *E.coli* – 48,6±4,9; 37,8±1,2% соответственно. Наименьшую чувствительность проявил штамм *E.coli* M-17 – 8,6±2,8, что в 8,9 раз меньше, чем в группе *S. aureus*, в 6,9 раз – в группе энтеробактерий, в 5,6 раз в группе *P. aeruginosa* и в 4,3 раза в группе типичных *E.coli* и в 6,6 раз в группе лактобактерий. Таким образом, наиболее устойчивы к антагонистическому действию гемолитических *E.coli* штамм *E.coli* M-17 и типичные *E.coli*.

При сравнении антагонистической активности 3-х групп *E.coli* Hly+ на индикаторные штаммы энтеробактерий, обнаружено, что все они проявляют наибольшую активность к *K. pneumoniae*. Штаммы *E. coli* O-151, *S. enteritidis* были чувствительны к действию бактериоцинов более, чем в 50% случаев, но отмечается наибольшее действие *E.coli* Hly+ с низкой ферментативной активностью. Самая низкая чувствительность к факторам антагонизма прослеживается у *S. flexneri*: лактозонегативные гемолитические *E.coli* не активны по отношению к ней, *E.coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью проявляют антагонизм в 6,2±3,0% случаев, а со слабовыраженной ферментативной активностью – в 26,7±6,6% ($p < 0,01$), т. е. в 4 раза больше. При сравнении антагонистической активности 3-х групп *E.coli* Hly+ на представителей патогенных и типичных кишечных палочек, обнаружено, что все 3 группы проявляют высокую активность к патогенным культурам кишечных палочек. Так культура *E.coli* O-151 в 1,7 раз случаев больше была чувствительна к действию бактериоцинов *E.coli* Hly+ с выраженной ферментативной активностью ($p < 0,001$), в 1,6 раз случаев к действию *E.coli* Hly+ со слабовыраженной ферментативной ак-

тивностью ($p < 0,001$) и в 2 раза к действию лактозонегативных *E.coli* Hly+ ($p > 0,01$), чем типичные кишечные палочки. При изучении антагонистического действия *E.coli* Hly+ на представителей нормальной микрофлоры кишечника, обнаружено, что лактобактерии более чувствительны – у $57,5 \pm 1,9\%$ штаммов лактобактерий отмечается подавление роста, тогда как типичные эшерихии подавляли свой рост в $37,8 \pm 1,2\%$ случаев, т.е. в 1,5 раза меньше. Так же выявлено неравнозначное действие антагонистической активности 3-х групп гемолитических эшерихий представителей биоценоза кишечника. Наиболее чувствительны лактобактерии были к действию лактозонегативных – $82,0 \pm 2,2\%$ и со слабовыраженной ферментативной активностью $68,8 \pm 1,8\%$ *E.coli* Hly+, что в 2,9 и 2,4 раза больше, чем действие гемолитических эшерихий с выраженной ферментативной активностью – $28,3 \pm 2,0\%$. ($n > 30, p < 0,001$). Типичные эшерихии были наиболее чувствительны к действию гемолитических эшерихий со слабовыраженной – $48,9 \pm 3,3\%$ и выраженной – $39,6 \pm 3,2\%$ ферментативной активностью. Антагонистическое действие на лактобактерии лактозонегативных *E.coli* Hly+ в 3,3 раза; со сниженной ферментативной активностью – в 1,4 раза достоверно больше, чем на типичные *E.coli* ($n > 30, p < 0,001$) и, наоборот, гемолитические эшерихии с выраженной ферментативной активностью наибольший антагонистический эффект оказывали на типичные *E.coli* $40,0 \pm 3,2$ против $28,3 \pm 2,0\%$ лактобактерий, т.е. в 1,4 раза больше ($n > 30, p < 0,001$).

По зоне подавления роста энтеробактерий, *E.coli* M-17 так же оказались наиболее устойчивыми – $0,9 \pm 0,5$ мм, а типичные кишечные палочки, наоборот, самыми чувствительными – $10,8 \pm 0,5$ мм. Штаммы *S. aureus* и энтеропатогенные бактерии одинаково подавляли рост – $7,6 \pm 0,9$ и $8,4 \pm 0,8$ мм. По сравнению с типичной *E.coli* как представителя нормальной флоры кишечника человека, все индикаторные штаммы кроме *E.coli* M-17, проявляли более высокую чувствительность к антагонистическому действию *E.coli* Hly+. Так, *S. aureus* в 2 раза ($p = 0,001, n > 30$), энтеробактерии в 1,6 раз ($p < 0,01, n > 30$), *P.aeruginosa* – в 1,3 раза ($p < 0,001, n > 30$). *E.coli* M-17 были устойчивее к антагонистическому действию гемолитической *E.coli* в 4,4 раза ($p < 0,001, n > 30$), чем типичные

кишечные палочки. По зоне подавления роста лактобактерии также оказались менее устойчивыми, чем типичные *E.coli* к действию всех трех групп гемолитических эшерихий: от $15,4 \pm 0,9$ до $21,4 \pm 0,7$ мм. (M+m). Наибольшее подавление роста отмечено к действию лактозонегативных гемолитических *E.coli* – $21,4 \pm 0,7$ мм., тогда как типичные эшерихии наиболее подавляли свой рост при действии *E.coli* Hly+ с выраженной и слабовыраженной ферментативной активностью. Так подавление роста лактобактерий было достоверно больше, чем у представителей типичных *E.coli* ($n > 30, p < 0,001$) при действии лактозонегативных *E.coli* Hly+ в 9,3 раза, слабоферментирующих *E.coli* Hly+ в 3,2 раза и с нормальной ферментативной активностью в 3,5 раз.

Выводы. Штаммы гемолитической *E. coli* обладают антагонистическим, в т. ч. бактериоцинопродуцирующим действием со способностью ингибировать рост как близкородственных патогенных и условно патогенных энтеробактерий, в т. ч. типичную кишечную палочку, так и неродственных микроорганизмов – стафилококков, псевдомонад, лактобактерий. Антагонистическое действие бактериоцинов изучаемых штаммов низкое по отношению к БТП «Колибактерин» – *E.coli* M-17 и по чувствительности и по подавлению зоны роста. В отношении патогенных и условно патогенных энтеробактерий, антагонистическая активность выше к *K. pneumoniae*, ниже к *S. flexneri*. Средняя бактерицидная активность обнаружена к представителю диареогенных кишечных палочек – *E.coli* O-151 и к *S. enteritidis* и невысокая к типичным представителям *E.coli*. Обнаружена антагонистическая активность к неродственным микроорганизмам, особенно к лактобактериям и золотистому стафилококку. Среди представителей нормофлоры толстого кишечника, лактобактерии в несколько раз оказались наиболее чувствительными к действию гемолитических эшерихий, чем типичные *E.coli* и по процентному содержанию и по зоне подавления роста.

Из трех групп *E.coli* Hly+ наибольшую антагонистическую активность на изученные индикаторные группы, кроме лактобактерий, проявляют штаммы со слабовыраженной ферментативной активностью, наименьшую – лактозонегативные. *E.coli* Hly+ оказывают выражен-

ный антагонистический эффект на патогенные (кроме *S. flexneri*), непатогенные представители энтеробактерий, не являющихся нормофлорой кишечника и лактобактерии. Их активность их ниже при действии на типичные эшерихии. Антагонистическая активность *E.coli* Нпу+ на лактобактерии более выражена у штаммов с отсутствием или слабовыраженным лактозным признаком.

Из проделанного фрагмента работы вытекает два аспекта для последующего изучения:

1. Формирование персистенции патогенных, условно патогенных энтеробактерий и неродственных микроорганизмов за счет устойчивости к бактериоцинам.

2. Направленный подбор при дисбактериозе биотерапевтических препаратов с более выраженными антагонистическими свойствами для воздействия на персистирующие патогенные и условно патогенные бактерии.

Таблица 1

Чувствительность индикаторных штаммов к антагонистическому действию гемолитических *E.coli*

№ п/п	Группы индикаторных штаммов	Число проведенных исследований	Чувствительность, % $M \pm m$	Чувствительность в количественном выражении (в мм подавления роста) $M \pm m$
1.	Патогенные и условно патогенные энтеробактерии (ЭПЭП и УПЭБ)	408	$\frac{216}{59,9 \pm 25,0}$	8,4±0,8
2.	<i>E.coli</i> M-17	105	$\frac{9}{8,6 \pm 2,8}$	0,9±0,5
3.	<i>P.aeruginosa</i>	105	$\frac{51}{48,6 \pm 4,9}$	3,7±0,9
4.	<i>S. aureus</i>	105	$\frac{81}{77,1 \pm 4,1}$	7,6±0,9
5.	Типичные <i>E.coli</i>	1680	$\frac{636}{37,8 \pm 1,2}$	10,8±0,5
6.	Лактобактерии	1482	$\frac{853}{57,5 \pm 1,9}$	17,7±0,8

Таблица 2

Количественные характеристики антагонистического действия гемолитических *E.coli* 3-х групп на бактерии семейства *Enterobacteriaceae*

№ п/п	Штаммы индикаторных энтеробактерий	<i>E.coli</i> с нормальной ферментативной активностью	<i>E.coli</i> со сниженной ферментативной активностью	Лактозонегативные <i>E.coli</i>
		$M \pm m$ (мм)	$M \pm m$ (мм)	$M \pm m$ (мм)
1.	<i>E. coli</i> O- 151	7,8±1,1	7,3±0,7	8,5±2,5
2.	<i>S. enteritidis</i>	7,3±1,4	5,6±0,7	4,2±1,5
3.	<i>S. flexneri</i>	0,6±0,2	1,5±0,5	0
4.	<i>K. pneumoniae</i>	18,6±1,4	20,3±1,1	10,5±2,4
5.	Типичные <i>E. coli</i>	4,4±0,4	5,1±0,5	2,3±0,4
6.	Лактобактерии	15,4±0,9	16,3±0,5	21,4±0,7

**Чувствительность патогенных энтеробактерий
к 3-м группам дисбактериозных гемолитических E.coli (% M±m)**

№ п/п	Штаммы индикаторных энтеробактерий	E.coli с нормальной ферментативной активностью	E.coli со сниженной ферментативной активностью	Лактозонегативные E.coli
		48 штаммов	45 штаммов	12 штаммов
1	E. coli O-151	<u>33</u> 68,8±6,7	<u>36</u> 80,0±6,0	<u>6</u> 50,0±14,4
2	S. enteritidis	<u>27</u> 56,2±7,2	<u>30</u> 66,7±7,0	<u>6</u> 50,0±14,4
3	S. flexneri	<u>3</u> 6,2±3,4	<u>12</u> 26,7±6,6	0
4	K. pneumoniae	<u>45</u> 93,8±3,4	<u>45</u> 100,0	<u>9</u> 75,0±12,5
5	Типичные E. coli	<u>19</u> 39,6±3,2	<u>22</u> 48,9±3,3	<u>3</u> 25,0±5,6
6	Лактобактерии	<u>28</u> 28,3±2,0	<u>38</u> 68,8±1,8	<u>16</u> 82,0±2,2

Таблица 4

**Антагонистическая активность 3 групп гемолитических E. coli
в отношении типичных E.coli и лактобактерий (в количественном выражении – в мм)**

№ п/п	гемолитические E. coli	Число n	M±m (мм) типичные E.coli	Число n	M±m (мм) лактобактерии
1	с нормальной ферментативной активностью	240	4,4±0,4	513	15,4±0,9
2	со сниженной ферментативной активностью	225	5,1±0,5	657	16,3±0,5
3	лактозонегативные	180	2,3±0,4	312	21,4±0,7

Примечания:

1. Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления. Журн. микробиол., 2003, № 3, с. 109-113.
2. Блинкова Л.П. Получение томицида – нового бактериального препарата и изучение его биологической активности. Дис. д-ра биол. наук. М., 1986.
3. Бондаренко В.М., Червинец В.М., Воробьев А.А. Роль персистирующих условно- патогенных бактерий в патогенезе язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки. Журн. микробиол., 2003, № 4, с. 11-17.
4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М. Медицина, 1999г. с.365.
5. Красноголовец В.Н. Дисбактериоз кишечника. М. Медицина, 1989г. с.208.
6. Мазанкова Л.Н., Запруднов А.М. Микроэкология кишечника у детей в норме и патологии. Рос. мед. вести. – 1996. – №1. с.34-43.
7. Методические рекомендации «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника», М.: 1977. – 25с.
8. Постникова Е.А., Ефимов Б.А., Володин Н.Н., Кафарская Л.И. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов. Журн. микробиол., 2004, №2, с. 64-69.
9. Чеснокова М.Г. Дисбактериоз у больных полипозом толстой кишки. Журн. микробиол., 2001, №5, с.65-68.