

PROBIOTIKU UN TO GLIKOPEPTĪDU ANTIMIKROBIĀLĀ IEDARBĪBA IN VITRO PRET GOVJU MASTĪTA IEROSINĀTĀJIEM

ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VITRO OF PROBIOTICS AND ITS GLYCOPEPTIDES AGAINST CAUSATIVE AGENTS OF BOVINE MASTITIS

Gundega Gulbe¹, Anda Valdovska²

¹ LLU, Biotehnoloģijas un Veterinārmedicīnas zinātniskais institūts “Sīgra”, Latvija

² LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija

¹ LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “Sīgra”, Latvia

² LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

gundega.gulbe85@gmail.com

ABSTRACT

Probiotic therapy is a substantial alternative to antibiotics for treatment of bovine mastitis. The most used probiotics are lactic acid bacteria which produce bacteriocins – peptides and proteins with antagonistic activity to pathogens. The aim of this study was to detect an antimicrobial activity of probiotics and its glycopeptides *in vitro* against causative agents of bovine mastitis as well as to test hemolytic activity of glycopeptides. *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus pentosaceus*, glycopeptides of *Lactobacillus helveticus* in titre 10^9 cfu g⁻¹ (GP1), in titre 10^7 cfu g⁻¹ added casein (GP2) and GP1 glycopeptides in titre 10^7 cfu g⁻¹ with β -glucans (GP3) were tested *in vitro* to determine its antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* and mixed culture of above mentioned microorganisms isolated from raw milk of cows with subclinical mastitis. Antibiotic suspension “Pen Strep” and amoxicillin with clavulanic acid were used as control. The antimicrobial activity of bacterial isolates was tested by well and disk diffusion assays. Results obtained that GP1 had a greatest inhibitory effect (8.83 ± 3.02 mm) against bacterial cultures while GP2 and GP3 as well worked effectively (6.67 ± 1.73 and 5.67 ± 1.52 mm, resp.) in dilution 20 mg mL^{-1} . GP1 had a greatest inhibitory effect also in dilution $20 \text{ mg } 0.5 \text{ mL}^{-1}$ (15.42 ± 0.31 mm), whereas GP3 and GP2 showed lower growth inhibition (4.14 ± 0.21 mm and 2.67 ± 0.00 mm, resp.). Zone of antibacterial clearance of “Pen Strep” and AMC30 was 48.13 ± 0.53 mm and 22.86 ± 0.23 mm, respectively. All bacterial strains were resistant to test solutions containing *L. reuteri* and *P. pentosaceus*. Glycopeptides displayed no hemolysis (γ -hemolysis) when tested with sheep blood indicating that it is non-pathogenic and this is important when peptides are considered to be used as intramammary drugs. Conclusion: The applied test solution which contains *L. helveticus* glycopeptides in titre 10^9 cfu g⁻¹ displayed antagonistic activity against a variety of pathogens and can be used as an effective alternative to antibiotic therapy.

KEY WORDS: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *L. helveticus*, antimicrobial activity, mastitis.

IEVADS

Mastīts jeb tesmeņa iekaisums ir visbiežāk sastopamā slimība piena liellopu ganāmpulkos un ir galvenais iemesls ekonomiskajiem zaudējumiem piena ražošanā visā pasaulē (Maréchal et al.,

2011). Tradicionāli mastīta ārstēšanas pamatā ir sintētisko antibiotiku lietošana, kas ne vienmēr ir efektīva, turklāt saistīta ar patērētājiem kaitīgo atliekvielu klātbūtni pienā un sekmē pret antibiotikām rezistentu baktēriju celmu attīstību. Turklāt bioloģiskās lauksaimniecības apstākļos antibiotiku izmantošana produktīvo dzīvnieku ārstēšanā ir ļoti ierobežota un saistīta īpašniekam ar papildus zaudējumiem. Šo problēmu dēļ pēdējo gadu laikā intensīvi notiek pētījumi ar mērķi izveidot dabiskus antibakteriālus līdzekļus.

Nozīmīga alternatīva antibiotiku terapijai ir probiotiskie terapeitiskie līdzekļi, ko var pielietot gan mastīta ārstēšanā, gan profilaksē (Cao et al., 2007; Klostermann et al., 2010; Soleimani et al., 2010; Espeche et al., 2012; Frola et al., 2012). Galvenokārt, kā probiotiskas tiek pielietotas pienskābās baktērijas, kas ir drošas, nepatogēnas un darbojas antagonistiski patogēnajiem mikroorganismiem. Pienskābajām baktērijām piemīt vairākas īpašības, kuru dēļ tās var izmantot kā probiotikas, lai kontrolētu patogēnos mikroorganismus. Tām piemīt spēja piesaistīties šūnām, samazinot patogēno baktēriju piesaistīšanās iespējas; ir spēja saistīties ar patogēnajām baktērijām, bloķējot to darbību; organisko skābju un ūdeņraža pārskābes producēšana rada patogēno baktēriju augšanai nelabvēlīgu vidi; tās spēj veidot bakteriocīnu un citas baktericīdas vielas (Soleimani et al., 2010).

Līdz šim probiotiskās baktērijas galvenokārt tika pielietotas gremošanas sistēmas infekciju profilaksē un barības sagremojamības uzlabošanā (Tambekar un Bhutada, 2010; Venkatesan, 2012), taču šīs baktērijas ir arī daļa no normālās, aizsargājošās pupa kanāla mikrofloras. Autori pierādījuši, ka pienskābās baktērijas un to sintezēto bakteriocīdo vielu izmantošana ir efektīva arī mastīta ārstēšanā (Cao et al., 2007; Klostermann et al., 2010; Soleimani et al., 2010; Espeche et al., 2012; Frola et al., 2012). Zināms, ka pienskābās baktērijas producē bakteriocīnus, kam piemīt antibakteriālas īpašības (Hécharde un Sahl, 2002; Bauer un Dicks, 2005), tādēļ mūsu pētījuma mērķis bija noskaidrot dažu pienskābo baktēriju un no tām izolēto glikopeptīdu iedarbību *in vitro* uz govju subklīniska mastīta ierosinātājiem.

MATERIĀLS UN METODIKA

Antibakteriālās aktivitātes pārbaudei izmantojām probiotiskās baktērijas *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*), *Pediococcus pentosaceus* (*P. pentosaceus*), *L. reuteri* kopā ar *P. pentosaceus*, kā arī *Lactobacillus helveticus* glikopeptīdus. Glikopeptīdu kultūras iedalījām - *L. helveticus* glikopeptīdi 10^9 kvv g^{-1} (GP1); GP1 10^7 kvv g^{-1} pievienots kazeīns (GP2) un GP1 10^7 kvv g^{-1} pievienoti β glukāni (GP3). Testa kultūras tika atšķaidītas ar peptona sāls šķīdumu (Oxoid, UK) (20 mg uz 1 mL un 20 mg uz 0.5 mL). Salīdzinājumam izmantojām arī antibiotiku suspensiju "Pen Strep" (V.M.D., Beļģija) un antibiotiku difūzijas diskus, kas satur amoksicilīnu un klavulānskābi 30 mkg (AMC30) (Becton Dickinson, USA).

Glikopeptīdu antagonistisko iedarbību pārbaudījām uz baktēriju kultūrām, kas izolētas no aseptiski noņemtiem piena paraugiem govīm ar subklīnisko mastītu (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* un jaukta visu minēto baktēriju kultūra).

Antagonistisko iedarbību novērtējām pielietojot bedrīšu difūzijas metodi (Mami et al., 2008) – uz triptona sojas agara barotnēm (Oxoid, UK) tika inokulēts 0.1 mL baktēriju kultūras peptona sāls šķīdumā atšķaidījumā 1.5×10^8 kvv/mL (0.5 Mc Farland) un 0.75×10^8 kvv/mL (0.25 Mc Farland). Agarā tika izgrieztas bedrītes (6 mm) un iepildīti 30 μ L testa antimikrobie šķīdumi GP1, GP2 un GP3. Plates tika sagatavotas 3 atkārtojumos, inkubētas 24 h 37 °C un noteikts baktēriju augšanas nomākums. Aprēķinājām vidējo aritmētisko rādītāju (mm) un standartnovirzi.

Glikopeptīdu suspensijas hemolītiskās aktivitātes pārbaudei uz asins agara barotnēm (Oxoid, UK) Petri platēs, kas satur 50 g L⁻¹ aitu asinis, svītru veidā tika izsēti glikopeptīdu šķīdumi vairākos atšķaidījumos (20 mg, 10 mg un 5 mg uz 0.5 mL), inkubēts 24 h 37 °C un noteikta hemolīze - β-hemolīze (dzidra un caurspīdīga zona ap kolonijām), α- hemolīze (zaļgana zona ap kolonijām) vai γ- hemolīze (hemolīze nenotiek) (Ataoglu et al., 2010).

REZULTĀTI

Glikopeptīdu antimikrobiālā aktivitāte tika noteikta pret vairākiem patogēniem mikroorganismiem, kuri izolēti no subklīniska mastīta skartiem govju piena dziedzeriem. 1.tabulā apkopoti rezultāti par glikopeptīdu antagonistiskās aktivitātes izraisīto baktēriju nomākumu uz agara platēm.

1. tabula / Table 1

Glikopeptīdu antimikrobiālā iedarbība Antimicrobial activity of glycopeptides

Patogēnās baktērijas / Pathogens	Nomākuma zonas diametrs (mm) Zone of inhibition in diameter (mm)					
	koncentrācija 20 mg mL ⁻¹ concentration 20 mg mL ⁻¹			koncentrācija 20 mg 0.5mL ⁻¹ concentration 20 mg 0.5mL ⁻¹		
	GP1	GP2	GP3	GP1	GP2	GP3
<i>S. aureus</i>	0.00 ± .00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	14.17 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>S. saprophyticus</i>	6.33 ± 5.51	6.67 ± 5.77	0.00 ± 0.00	12.17 ± 0.29	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>S. uberis</i>	6.33 ± 5.51	10.67 ± 0.58	6.33 ± 5.51	22.17 ± 0.29	8.00 ± 0.00	7.83 ± 1.26
<i>K. kristinae</i>	9.67 ± 0.58	9.33 ± 0.58	9.33 ± 0.58	20.00 ± 0.50	0.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00
<i>E. coli</i>				11.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Jaukta kultūra / mixed culture	13.00 ± 0.50	0.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00	13.00 ± 0.50	0.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00
Vidēji / average	8.83 ± 3.02	6.67 ± 1.73	5.67 ± 1.52	15.42 ± 0.31	2.67 ± 0.00	4.14 ± 0.21

GP1 - *L. helveticus* glikopeptīdi 10⁹ kvv g⁻¹ / glycopeptides of *L. helveticus* 10⁹ cfu g⁻¹;

GP2 - GP1 10⁷ kvv g⁻¹ pievienots kazeīns / GP1 10⁷ cfu g⁻¹ added casein;

GP3 - GP1 10⁷ pievienoti β glukāni / GP1 10⁷ cfu g⁻¹ added β-glucans.

Novērtējot baktēriju vidējo auguma nomākumu ar testa kultūrām koncentrācijā 20 mg mL⁻¹, konstatējām, ka GP1 uzrādīja vislielāko antagonistisko aktivitāti uz baktēriju augšanu (8.83±3.02 mm), taču GP2 (6.67±1.73 mm) un GP3 (5.67±1.52 mm) ir zemāka aktivitāte. GP1 uzrādīja vislielāko antagonistisko aktivitāti arī 2 reizes lielākā koncentrācijā (15.42±0.31 mm), GP3 zemāku (4.14±0.21 mm), bet GP2 efektivitāte bija viszemākā (2.67±0.00 mm). *S. aureus* kultūra bija rezistenta pret visiem trim glikopeptīdu maisījumiem, izņemot pret GP1 koncentrācijā 20 mg 0.5 mL⁻¹, *S. saprophyticus* bija rezistenta pret GP3 šķīdumu, bet GP2 neuzrādīja antagonistisku iedarbību uz jaukto baktēriju kultūru.

Probiotisko baktēriju antimikrobiālās aktivitātes un salīdzinājumam arī antibiotiku efektivitātes uz izolētajām baktēriju kultūrām rezultāti skatāmi 2. tabulā.

2. tabula / Table 2

Antibiotiku un probiotiku antimikrobiālā iedarbība
Antimicrobial activity of antibiotics and probiotics

Patogēnās baktērijas / Pathogens	Nomākuma zonas diametrs (mm) Zone of inhibition in diameter (mm)				
	koncentrācija 20 mg 0.5mL ⁻¹ concentration 20 mg 0.5mL ⁻¹			Pen Strep	AMC30
	LR	PP	LR + PP		
<i>S. aureus</i>	0.00±0.00			59.67±0.29	29.67±0.29
<i>S. saprophyticus</i>				40.12±0.29	21.67±0.29
<i>S. uberis</i>				54.17±0.29	26.83±0.29
<i>K. kristinae</i>				54.00±1.00	32.00±0.00
<i>E. coli</i>				31.83±0.29	0.00±0.00
Jaukta kultūra /mixed culture				49.00±1.00	27.00±0.50
Vidēji/ average	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	48.13±0.53	22.86 ±0.23

LR – *L. reuteri*;

PP – *P. pentosaceus*;

LR+PP – abu probiotisko baktēriju maisījums/ mixed both probiotic bacteria;

„Pen Strep” radītais nomākums uz baktērijām vidēji bija 48.14±0.53 mm, bet antibiotiku diska AMC30 - 22.86±0.23 mm. Visi baktēriju celmi bija rezistenti pret probiotiku *L. reuteri* un *P. pentosaceus* un to apvienotajiem šķīdumiem. *E. coli* uzrādīja rezistenci pret AMC30.

Neviens no probiotiku un glikopeptīdu šķīdumiem GP1, GP2 un GP3 neuzrādīja hemolītisku darbību (gamma hemolīzi).

DISKUSIJA

Pēdējo 10 gadu laikā ir veikti daudzi pētījumi par probiotisko baktēriju ietekmi uz veselību. Tiek analizētas arvien jaunas šo baktēriju sintezētās baktericīdās vielas, un pētījumi ir daudzveidīgi metodikas un materiāla ziņā. Mūsu veiktajiem izmēģinājumiem par probiotisko baktēriju glikopeptīdu antagonistisko iedarbību uz baktērijām analogus pētījumus literatūrā neatradām. Līdzīgi pētījumi veikti par citiem pienskābo baktēriju sintezētajiem bakteriocīniem – nizīnu, pediocīnu, lantibiotikām u.c., kā arī par probiotisko baktēriju kultūru centrifugātiem.

Soleimani et al. (2012) ziņo par probiotisko laktobaktēriju centrifugāta (cell free supernatant– angl.) antagonistisko aktivitāti uz *S. aureus* celmu, kas izdalīts no mastīta piena un standarta *S. aureus* celmu ATCC 25923, pielietojot bedrīšu difūzijas metodi. Viņa rezultāti uzrāda, ka *L. plantarum* izraisa lielu nomākuma zonu uz *S. aureus*, 13 mm, bet standarta *S. aureus* ir rezistents pret laktobaktēriju centrifugātu. Venkatesan et al. (2012), kurš antibakteriālās aktivitātes pētījumiem izmantoja *Bifidobacterium sp.* un *Lactobacillus sp.* kultūru centrifugātu, novēroja attiecīgi 3-18 mm un 2-10 mm lielu nomākuma zonu 8 patogēno baktēriju kultūrās. Tambekar un Bhutada (2010), pielietojot modificētu disku difūzijas metodi, noteica, ka *L. plantarum* un *L. rhamnosus*, kas izolēti no kazu piena, ir stipra antibakteriāla iedarbība uz sešām patogēno baktēriju kultūrām (17-25 mm), bet šo baktēriju centrifugāta antagonistiskā ietekme ir vēl izteiktāka (19-27 mm).

Mūsu pētījumā pienskābās baktērijas *L. reuteri* un *P. pentosaceus* neuzrādīja nomākuma efektu uz patogēno baktēriju augumu. Taču glikopeptīdu antimikrobiālā iedarbība uz patogēnajām kultūrām ir ievērojama, un, atkarībā no glikopeptīdu veida un koncentrācijas, kā arī mikroorganismu veida un koncentrācijas, tā variē no 6.33 līdz 22.17 mm, turklāt GP1 (*L. helveticus* glikopeptīdi) izrādīja antagonistisku aktivitāti pret visām pārbaudītajām mastītu ierosinātāju kultūrām.

Vairāki pētnieki ir veikuši probiotiku un to peptīdu pārbaudes *in vivo* slaucamajām govīm. Frola ar līdzautoriem (Frola et al., 2012) ievadīja *L. perolens* un *L. plantarum* laktējošu govju piena dziedzeros un konstatēja augstu antagonistisku iedarbību pret eksperimentāli ievadītām patogēnajām baktērijām. Turklāt, ievadot probiotiskās baktērijas intramammāri koncentrācijā 10^6 kvv mL^{-1} , netika konstatētas klīniskas sasilšanas pazīmes, nedz arī pupa kanāla bojājumi. Klosterman ar kolēģiem (Klosterman et al., 2010) veica izmēģinājumus ar *L. lactis* saturošu pupu apstrādes līdzekli pirms un pēc govju slaukšanas. Tika veikta pupu galu eksperimentāla kontaminācija ar dažādu ģinšu mikroorganismiem, tad iemērca pupus probiotikas saturošā preparātā. Pēc 10 min. konstatēja baktēriju skaita samazināšanos par 80-97%. Cao et al. (2007) govīm intramammāri ievadīja 0.8 g nizīnu (*L. lactis* producēts polipeptīds) 4.5 IU mL^{-1} , un noskaidroja, ka šāda terapija samazina *S. aureus* daudzumu pupa kanālā par 54% (salīdzinoši antibiotiku gentamicīna terapija par 33.3%).

Attīstot probiotisko produktu, ir svarīgi noteikt izvēlēto baktēriju nekaitīgumu. Lai gan *Lactobacillus* un *Pediococcus* probiotisko baktēriju ģintis pēc ilgstošiem pētījumiem kopumā tiek uzskatītas par pilnīgi drošiem un nepatogēniem mikroorganismiem, nepieciešams veikt pārbaudi, lai noteiktu glikopeptīdu hemolītisko aktivitāti un antibiotiku rezistenci (Espeche et al., 2012). Ataoglu et al. (2010) noteica hemolītisko aktivitāti *P. pentosaceus* OZM celmam un rezultāti rādīja, ka šis celms nerada hemolīzi. Arī mūsu pētījumā iekļauto probiotisko baktēriju un to glikopeptīdu šķīdumi neizraisīja hemolīzi. Otrs nozīmīgs patogenitātes raksturotājs ir antibiotiku rezistence, ko pētījuma ietvarā ir paredzēts veikt turpmāk.

SECINĀJUMI

1. Pētījumā pielietotais testa šķīdums, kas satur *L. helveticus* glikopeptīdus, uzrāda antibakteriālu iedarbību pret mastīta ierosinātājiem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Kocuria kristinae*, *Streptococcus uberis* un *Escherichia coli*, un ir pamats uzskatīt, ka to var izmantot, lai veidotu terapeitisku līdzekli govīm mastītu ārstēšanā un profilaksē un kā efektīvu alternatīvu antibiotiku terapijai.
2. Glikopeptīdu šķīdumi *in vitro* nerada hemolīzi, kas norāda uz darbību dzīvajos audos bez destruktīvas ietekmes.

PATEICĪBA

Glikopeptīdu izolēšana veikta RSU Mikrobioloģijas un Virusoloģijas institūtā ERAF projekta Nr.2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/VIAA/125 ietvarā, bet izmēģinājumi – LLU Biotehnoloģijas un Veterinārmedicīnas zinātniskajā institūtā „Sigrā” pateicoties ERAF projekta Nr.2010/0226/2DP/2.1.1.1.0/10/APIA/ VIAA/099 finansiālajam atbalstam.

LITERATŪRA

1. Ataoglu, H., Kiran, F., Osmanagaoglu, O. Evaluation of *in vitro* Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2010; 2:162-174.

2. Bauer, R., Dicks, L.M.T. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 2005; 101: 201-216.
3. Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y. Efficacy of Nisin in Treatment of Clinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 2007; 90: 3980-3985.
4. Espeche, M.C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M.E.F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*. 2012; 18:103-109.
5. Frola, I.D., Pellegrino, M.S., Espeche, M.C., Giraudo, J.A., Nader-Macias, E.F., Bogni C.I. Effects of intramammary inoculation of *Lactobacillus perolens* CRL1724 in lactating cows' udders. *Journal of Dairy Research*. 2012; 79: 84-92.
6. Héchar, Y., Sahl, H.-G. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*. 2002; 84: 545-557.
7. Klostermann, K., Crispie, F., Flynn, J., Meaney, W.J., Paul Ross, R., Hill, C. Efficacy of a teat dip containing the bacteriocin lacticin 3147 to eliminate Gram-positive pathogens associated with bovine mastitis. *Journal of Dairy Research*. 2010; 77(2): 231-8.
8. Mami, A., Henni, J.E., Kihal, M. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* species Isolated from Algerian Raw goat's Milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 2008; 3: 39-49.
9. Maréchal Le, C., Thiéry, R., Vautor, E., Loir Le, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. *Dairy Sciences & Technologies*. 2011; 91: 247–282.
10. Soleimani, N.A., Kermanshahi, R.K., Yakhchali, B., Sattari T.N. Antagonistic activity of probiotic *Lactobacilli* against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4(20): 2169-2173.
11. Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. Acid bile tolerance, Antibacterial activity, Antibiotic Resistance and Bacteriocins Activity of Probiotic *Lactobacillus* sp. *Recent Research in Science and Technology*. 2010; 2(4): 94-98.
12. Venkatesan, S., Kirithika, M., Roselin, I., Ganesan, R., Muthuchelian, K. Comparative invitro and invivo study of three probiotic organisms, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *S.cerevisiae* and analyzing its improvement with the supplementation of prebiotics. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 2012; 2: 94-106.