

УДК 619:602.3:579.864:579.873.13:576.52

DOI 10.36016/VM-2020-106-14

ВИВЧЕННЯ РІВНЯ АДГЕЗИВНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ КУЛЬТУР ЗА РІЗНИХ ТЕРМІНІВ ЗБЕРЕЖЕННЯ

Гужвинська С. О., Палій А. П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: aspirantura.iecvm@gmail.com

Павліченко О. В.

Харківська державна зооветеринарна академія, Харків, Україна

У статті представлені результати вивчення рівня адгезивної активності пробіотичних культур. Установлено, що досліджувані культури по різному проявляли здатність до адгезії. Найвищий коефіцієнт адгезії виявився у штаму *B. adolescentis* 17 ($64,2 \pm 7,30\%$), *B. adolescentis* 23 ($61,5 \pm 3,27\%$), *B. adolescentis* 17-316 ($60,1 \pm 5,97\%$) і *L. plantarum* 7 ($59,8 \pm 5,01\%$). Дослідження показали, що через 3 роки зберігання високоадгезивними виявилися 4 (26,7%) та середньоадгезивними — 2 (13,3%) штами. Під час визначення адгезивних властивостей досліджуваних мікроорганізмів через 4 роки зберігання встановлено, що 4 (26,7%) мікроорганізми були високоадгезивними та 1 (6,7%) — середньоадгезивним

Ключові слова: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, еритроцити барана

Основним засобом профілактики та лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, спричинених дисбактеріозом, є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дозволяє покращити, а інколи й відновити стан мікрофлори кишечника та слизових оболонок організму тварин, що приводить до загального покращання стану здоров'я та запобігає розвитку цілої низки хронічних захворювань [2, 3, 5, 6].

Одержання групи новітніх біотехнологічних препаратів — пробіотиків — на основі попередньо відібраних і охарактеризованих представників нормальної мікрофлори тварин та птиці, зокрема штамів лакто- та біфідобактерій, є важливою проблемою сучасної біотехнології, адже сфери застосування цих пробіотичних препаратів значно розширюються, і пробіотичну терапію дедалі частіше ставлять на противагу антимікробній [7, 8]. Тому у сучасний період розширилась сфера виробництва пробіотиків на основі штамів лактобацил і біфідобактерій [13, 18].

Для того, щоб пробіотик був ефективним, бактеріям, які входять до його складу, має бути притаманний певний спектр біологічної активності [9, 11, 16].

Однією з важливих властивостей пробіотичних бактерій, що необхідна для захисту організму, є здатність до колонізації кишечника [4]. Стійкість до розмноження патогенної мікрофлори, так звана колонізаційна резистентність, забезпечується багатьма факторами, зокрема конкуренцією за місця адгезії та субстрати. В основі антагоністичної дії мікрофлори кишечника лежить здатність бактерій зв'язуватися з рецепторами на поверхні епітеліальних клітин і між собою, створюючи захисну плівку. Специфічність рецепторів адгезії закладено генетично у кожної окремої особини.

Критерії відбору штамів молочнокислих бактерій-претендентів для створення пробіотичних препаратів сьогодні описані в багатьох експериментально-аналітичних вітчизняних та іноземних працях [15]. Водночас системний поетапний план оцінки пробіотичного продуцента перебуває в стані розробки та постійного вдосконалення і регламентується переважно закордонними директивами ЄС, FAO/WHO [10, 12].

Одним з найперспективніших напрямів сучасної мікробіології є вивчення адгезивної здатності мікроорганізмів. Бактеріальне прилипання, як відомо, відіграє важливу роль у персистенції бактерій у багатьох екосистемах. Воно необхідне для колонізації нормальною

мікрофлорою організму господаря та разом з тим вважається першим кроком у патогенезі бактеріальних інфекцій, так як є проявом патогенності мікроорганізмів. Вивченню адгезивних властивостей пробіотичних бактерій приділяється значна увага [17].

Таким чином, одним із важливих критеріїв відбору молочнокислих бактерій є здатність до адгезії на клітинах епітелію макроорганізму.

Тому **метою** даної роботи було вивчення рівня адгезивної активності пробіотичних культур.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були молочнокислі бактерії: *Lactobacillus plantarum* 7, *L. delbrueckii* 8, *L. casei* var. *hamnosus* 9, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *L. plantarum* 19, *L. plantarum* 22, *L. casei* 27, *L. plantarum* 7-317, *Bifidobacterium bifidum* 1, *B. infantis* 14, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 23, *B. longum* 23, *B. adolescentis* 17-316, *B. adolescentis* 3. Під час дослідів культивування молочнокислих бактерій проводили на середовищах MRS та Блаурока. Бактерії культивували в термостаті впродовж 24–72 год за температури 37 °С [14].

Адгезивні властивості молочнокислих бактерій визначали за методикою В. І. Бриллїс. Під час досліджень використовували еритроцити барана. Спочатку добові культури центрифугували протягом 5 хв за 3 000 об./хв. Потім отриману біомасу ресуспендували в буфері PBS. Отримували суспензію бактерій, яка містила 10⁹ КУО/см³ за стандартом каламутності. Отримані суспензії бактеріальних та еритроцитарних клітин змішували у рівних об'ємах у пробірці. Суміш суспензії переносили до термостата та інкубували за температури 37 °С упродовж 30 хв. Після цього клітини двічі промивали центрифугуванням в буфері PBS за 200 об./хв впродовж 5 хв. З осаду клітин готували мазки, які фарбували за Грамом. Потім підраховували кількість адгезованих до еритроцитів клітин бактерій. Для оцінки адгезивних властивостей мікроорганізмів використовували середній показник адгезії (СПА), який визначали за середньою кількістю мікроорганізмів, що прикріплювались до поверхні одного еритроцита. Під час підрахунку враховували всі еритроцити, що знаходяться в п'яти полях зору, у сумі не менше 50. Із врахованих еритроцитів підраховували частку клітин, що мають на поверхні адгезовані мікроорганізми (К, %). Виходячи зі значень СПА і коефіцієнта К, підраховували індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ). Ступінь адгезивності досліджуваних бактерій оцінювали, виходячи із показника ІАМ. Бактерії вважали неадгезивними за ІАМ < 1,75, низькоадгезивним — від 1,76 до 2,5, середньоадгезивним — від 2,51 до 4,0 та високоадгезивним — > 4,0.

Кількість живих мікробних клітин визначали методом серійних розведень одержаної суспензії у фізіологічному розчині.

Кислотоутворення в молоці визначали за кількістю кислоти, що утворюється у знежиреному молоці за методикою Є. П. Квасникова.

Швидкість сквашування молока лакто- та біфідобактеріями оцінювали за методикою Л. О. Банникової.

Усі дослідження проводили у трьох повтореннях. Статистичну обробку результатів проводили за традиційними методами варіаційної статистики з використанням програми Excel та Statistica 10.

Результати досліджень та їх обговорення. Проведенні дослідження з визначення адгезивних властивостей лактобацил і біфідобактерій за різних термінів досліджень показали, що досліджувані бактерії здатні адгезувати до еритроцитів барана (табл.).

Здатність досліджуваних штамів активно адгезувати до еритроцитів баранів, на наш погляд, можна пояснити тим, що ці мікроорганізми є природними симбіонтами організму, що підтверджено даними літератури [1].

Проведенні експерименти показали, що через 2 роки зберігання штами *L. delbrueckii* 8, *L. casei* var. *hamnosus* 9, *L. casei* var. *rhamnosus* 14, *L. plantarum* 19, *B. adolescentis* 3 відносяться до низькоадгезивних, *B. bifidum* 1 і *B. infantis* 14 — середньоадгезивних, а *L. plantarum* 7, *L. plantarum* 22, *L. plantarum* 7-317, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 23 та *B. adolescentis* 17-316 — високоадгезивних. Штами *L. casei* 27 і *B. longum* 23 виявилися неадгезивними. Показники коефіцієнта адгезії *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 23, *B. adolescentis* 17-316 і *L. plantarum* 7 були найбільшими та склали 64,2 ± 7,30, 61,5 ± 3,27, 60,1 ± 5,97 і 59,8 ± 5,01 % відповідно. Дослідження показали, що через 3 роки зберігання неадгезивними виявилися 6 (40,0 %) штамів, низькоадгезивними — 3 (20,0 %), середньоадгезивними — 2 (13,3 %) та високоадгезивними — 4 (26,7 %).

Таблиця — Адгезивні властивості лактобактерій та біфідобактерій за різних термінів збереження ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Штам	Індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ)			Коефіцієнт адгезії, %		
	після 2 років зберігання	після 3 років зберігання	після 4 років зберігання	після 2 років зберігання	після 3 років зберігання	після 4 років зберігання
<i>L. plantarum</i> 7	6,7 ± 1,6	6,5 ± 1,5	6,3 ± 1,3	59,8 ± 5,01	58,7 ± 4,09	57,8 ± 4,71
<i>L. delbrueckii</i> 8	1,8 ± 0,5	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,3	47,9 ± 4,08	39,9 ± 2,08	47,9 ± 4,08
<i>L. casei</i> var. <i>hamnosus</i> 9	2,1 ± 0,6	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,5	38,4 ± 3,21	30,5 ± 2,27	22,4 ± 1,29
<i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> 14	2,3 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,2	39,5 ± 2,12	32,7 ± 2,17	31,2 ± 1,19
<i>L. plantarum</i> 19	2,5 ± 0,5	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,4	41,5 ± 3,27	38,7 ± 3,05	32,6 ± 2,17
<i>L. plantarum</i> 22	4,9 ± 2,0	2,7 ± 1,1	2,6 ± 1,30	51,4 ± 7,19	47,5 ± 4,77	43,5 ± 4,55
<i>L. casei</i> 27	1,7 ± 0,7	1,6 ± 0,6	1,6 ± 0,7	40,7 ± 2,01	39,5 ± 2,02	37,8 ± 1,97
<i>L. plantarum</i> 7-317	5,7 ± 1,9	5,5 ± 1,7	5,4 ± 1,8	57,8 ± 5,23	56,9 ± 4,97	54,7 ± 5,01
<i>B. bifidum</i> 1	3,0 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,7 ± 0,8	44,7 ± 2,17	39,6 ± 2,09	33,7 ± 1,97
<i>B. infantis</i> 14	3,1 ± 0,2	1,7 ± 0,7	1,5 ± 0,6	45,8 ± 1,15	39,7 ± 1,17	32,8 ± 1,02
<i>B. adolescentis</i> 17	7,3 ± 1,3	7,2 ± 1,1	7,0 ± 1,2	64,2 ± 7,30	60,2 ± 6,39	58,1 ± 6,02
<i>B. adolescentis</i> 23	5,8 ± 2,5	3,1 ± 0,9	1,8 ± 0,7	61,5 ± 3,27	57,3 ± 2,26	53,5 ± 2,47
<i>B. longum</i> 23	1,7 ± 0,8	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	48,8 ± 6,70	45,7 ± 4,67	43,1 ± 3,56
<i>B. adolescentis</i> 17-316	5,8 ± 1,7	5,7 ± 1,6	5,7 ± 1,7	60,1 ± 5,97	59,1 ± 4,87	59,0 ± 4,88
<i>B. adolescentis</i> 3	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	—	36,2 ± 1,17	30,1 ± 1,09	—

У результаті визначення адгезивних властивостей досліджуваних мікроорганізмів через 4 роки зберігання встановлено, що 4 (26,7 %) мікроорганізми були високоадгезивними, 1 (6,7 %) — середньоадгезивним, 2 (13,3 %) — низькоадгезивними та 8 (53,3 %) — неадгезивними.

Висновки. Установлено, що у *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 23, *B. adolescentis* 17-316 і *L. plantarum* 7 коефіцієнт адгезії виявився найбільшим і складав 64,2 ± 7,30, 61,5 ± 3,27, 60,1 ± 5,97 і 59,8 ± 5,01 % відповідно. Дослідження показали, що через 3 роки зберігання високоадгезивними виявилися 4 (26,7 %) та середньоадгезивними — 2 (13,3 %) штами. Під час визначення адгезивних властивостей досліджуваних мікроорганізмів через 4 роки зберігання встановлено, що 4 (26,7 %) мікроорганізми були високоадгезивними та 1 (6,7 %) — середньоадгезивним.

Список літератури

1. Гармашева І. Л. Коваленко Н. К. Адгезивні властивості молочнокислих бактерій і методи їх вивчення. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т. 67, № 4. С. 68–84.
2. Гужвинська С. О., Палій А. П. Біологічні властивості лактобактерій та біфідобактерій. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип. 32, ч. 1. С. 92–98. DOI: [https://doi.org/10.31073/vet_biotech32\(1\)-10](https://doi.org/10.31073/vet_biotech32(1)-10).
3. Гужвинська С. О. Вивчення біологічних властивостей лакто- та біфідобактерій-кандидатів у пробіотик. *Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб.* 2007. Вип. 60. С. 287–290.
4. Кігель Н. Ф., Насирова Г. Ф. Критерії відбору заквашувальних культур. *Вісник аграрної науки*. 2002. № 2. С. 58–60.
5. Коваленко Н. К. та ін. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і біфідобактерій. *Мікробіологічний журнал*. 2010. Т. 72, № 1. С. 9–17. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2010_72_1_3.
6. Ляковський Т. М. та ін. Ідентифікація пробіотичних штамів молочнокислих бактерій. *Мікробіологічний журнал*. 2008. Т. 70, № 6. С. 3–10.
7. Мосієнко В. С., Мосієнко М. Д., Рябуха В. М. Молочнокислі бактерії, їх властивості та використання в медичній практиці. *Український хімотерапевтичний журнал*. 2002. № 1(13). С. 16–23. URL: <http://www.ifp.kiev.ua/doc/journals/uhj/02/pdf02-1/18.pdf>.
8. Полтавська О. А., Коваленко Н. К. Антагоністичні властивості біфідобактерій, ізольованих із різних природних джерел. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т. 67, № 6. С. 32–39.

9. Старовойтова С. О., Карпов О. В. Перспективи використання пробіотичних мікроорганізмів в функціональних продуктах харчування та медицині. *Харчова промисловість*. 2015. № 18. С. 76–80. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khp_2015_18_16.
10. Янковский Д. С. Микробная экология человека: современные возможности её поддержания и восстановления. Киев: Эксперт ЛТД, 2005. 361 с.
11. Gujvinska S. O. et al. Biotechnology production of medium for cultivation and lyophilization of lactic acid bacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, No. 2. P. 5–11. URL: <https://www.ujecology.com/abstract/biotechnology-production-of-medium-for-cultivation-and-lyophilization-of-lactic-acid-bacteria-1225.html>.
12. Jamalifar H. et al. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 3, No. 1. P. 21–25. PMID: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22347578>.
13. Kasianenko O. I. et al. Application of mannan oligosaccharides (Alltech Inc.) in waterfowl: optimal dose and effectiveness. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, No. 3, P. 63–68. URL: <https://www.ujecology.com/abstract/application-of-mannan-oligosaccharides-alltech-inc-in-waterfowl-optimal-dose-and-effectiveness-55127.html>.
14. Paliy A. P. et al. Enhanced cultivation technology for lacto- and bifidobacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, No. 3. P. 83–87. URL: <https://www.ujecology.com/abstract/enhanced-cultivation-technology-for-lacto-and-bifidobacteria-55133.html>.
15. Paliy A. P. et al. Selection of technological regime and cryoprotector for lyophilization of lactobacteria (*Lactobacillus* spp.). *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, No. 4. P. 184–190. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_186.
16. Paliy A. P. et al. Specific composition of indigenous microflora (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactococcus* spp.) in farm animals. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, No. 1. P. 43–48. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_7.
17. Saranya S., Hemashenpagam N. Antagonistic activity and antibiotic sensitivity of Lactic acid bacteria from fermented dairy products. *Advances in Applied Science Research*. 2011. Vol. 2, No. 4. P. 528–534. URL: <https://www.primescholars.com/articles/antagonistic-activity-and-antibiotic-sensitivity-of-lactic-acid-bacteria-from-fermented-dairy-products.pdf>.
18. Woodmansey E. J. Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 102, No. 5. P. 1178–1186. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x>.

STUDY OF THE LEVEL OF ADHESIVE ACTIVITY OF PROBIOTIC CULTURES AT DIFFERENT STORAGE PERIODS

Guzhvyńska S. O., Paliy A. P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Pavlichenko O. V.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

*The paper presents the results of studying the level of adhesive activity of probiotic cultures. It has been found that the studied cultures showed different ability to adhesion. The highest adhesion coefficient was found in the strains *B. adolescentis* 17 ($64.2 \pm 7.30\%$), *B. adolescentis* 23 ($61.5 \pm 3.27\%$), *B. adolescentis* 17-316 ($60.1 \pm 5.97\%$), and *L. plantarum* 7 ($59.8 \pm 5.01\%$). Studies have shown that after 3 years of storage, 4 strains (26.7%) turned out to be highly adhesive, and 2 strains (13.3%) — medium adhesive. When determining the adhesive properties of the studied microorganisms after 4 years of storage, it was found that 4 microorganisms (26.7%) were highly adhesive and 1 (6.7%) — medium adhesive*

Keywords: *Lactobacillus, Bifidobacterium, ram erythrocytes*