

УДК 579.864.1:57.042:579.24

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS* *SPP.* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ЇХ В АЕРОБНИХ ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНИХ УМОВАХ

Бабич Є. М.¹, Калініченко С.В.¹, Коротких О.О.¹,
Рижкова Т. А.¹, Скляр Н.І.¹, Маслій І.Г.², Балак
А.К.³, Шкодовська Н.Ю.¹, Багача М. Б.¹

1 – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України»

2 – ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини» Національної академії
аграрних наук України

3– Харківський національний медичний
університет

Для корекції дисбіотичних станів найчастіше використовуються пробіотики, до складу яких входять лактобактерії [1-8].

Лактобактерії відносяться до облигатних представників мікрофлори людини, вони більшою чи меншою мірою присутні в усіх відкритих порожнинах організму. Видовий склад лактобактерій дуже різноманітний [9-12]. До теперішнього часу вивчено загальні біологічні властивості тільки окремих видів, що мешкають в організмі людини. Однак, вивчення властивостей вже відомих пробіотичних штамів не можна вважати завершеним [2, 7, 10-13]. Зазначене надає можливість подальшого пошуку й відбору кандидатів, перспективних для розробки пробіотичних препаратів.

Початковим етапом досліджень в зазначеному напрямку є визначення ростових властивостей вихідних штамів. Це обумовлено тим, що більшість комерційних препаратів містять ліофілізовані лактобактерії, які знаходяться в стані анабіозу. Враховуючи те, що кількість життєздатних клітин суттєво впливає на ефективність пробіотику, контроль за їх вмістом має важливе значення.

Наряду із вище приведеним, до початкового обсягу досліджень слід віднести і вивчення колонізаційної характеристики лактобактерій за допомогою здатності їх до адгезії.

Проблема формування популяцій бактерій різних за чутливістю до антибіотиків безпосередньо стосується і лактобактерій. Лактобактерії природно досить стійкі до цілого ряду антибіотичних речовин, що дозволяє використовувати їх в якості профілактичного засобу в процесі антибіотикотерапії. Проте, на цей час безупинно удосконалюються вже існуючі і створюються нові протимікробні препарати. Саме тому, необхідний постійний моніторинг антибіотикорезистентності лактобактерій.

Згідно з даними літератури, різні умови у біологічних нішах людського організму можуть суттєво відрізнятися від створених *in vitro* за багатьма параметрами, у тому числі і за газовим

складом атмосфери інкубації [14]. Хоча більшість штамів лактобактерій являються аеротолерантними, оптимумом для них є мікроаерофільні умови [9]. У доступній нам літературі ми не знайшли даних щодо вивчення біологічних властивостей лактобактерій за різних умов газового складу атмосфери культивування.

Мета роботи: визначення підходів до підвищення пробіотичних властивостей (ростові, колонізаційні) лактобактерій за різних умов культивування та їх вплив на чутливість до антибіотиків.

Матеріали та методи дослідження

Штами *L. acidophilus*, *L. plantarum* було отримано з пробіотичних препаратів «Лактобактерин» виробництва м. Перм (Росія), ЗАТ «Біолік» м. Харків, синбіотичного препарату Flora dophilus FOS.

Визначення життєздатності клітин пробіотичних штамів лактобактерій визначали наступним чином: із кожної серії відповідного пробіотичного засобу досліджували три зразки. Вміст флакону (ампули, капсули) розводили 0,9 % фізіологічним розчином із розрахунку 1 мл розчину на 1 дозу пробіотику (маточна суспензія). З маточної суспензії робили послідовні десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-9} . З кожного розведення робили висіви по 0,1 мл на тверде поживне середовище МРС та засівали по 1,0 мл на рідке середовище МРС (9,0 мл). Усі проби інкубували при 37 °С протягом 48 годин.

Кількість мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у кількості посівного матеріалу з урахуванням розведення за формулою:

$$X=10NM$$

де X – число КУО,

10 – постійний коефіцієнт при посіві 0,1 мл суспензії,

N – кількість колоній,

M – розведення (в 10, 100, 1000 рази тощо).

Отримані показники виражали в десяткових логарифмах (lg КУО/мл).

Вивчення адгезивних властивостей лактобактерій проводили за методикою визначення адгезивного процесу у мікроорганізмів (В. І. Бриліс та ін.) [15].

Чутливість мікроорганізмів до протимікробних препаратів вивчали диско-дифузійним методом Kirby-Bauer з використанням готових комерційних паперових дисків, імпрегнованих антибіотиками (НДЦФ, м. Санкт-Петербург, Росія) на середовищі Мюлер-Хінтона згідно з наказом № 167 МОЗ України Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.07 р. Для постановки дослідів використовували маточні суспензії бактерій, що відповідали 0,5 од. за шкалою McFarland. Інкубацію проводили при температурі 37 °С впродовж 24

годин. Результати вивчення антибіотикорезистентності інтерпретували відповідно до рекомендацій, що розроблені комітетом клінічних та лабораторних стандартів США (NSSLs) від 1991 р. і наказу МОЗ України №167. Зменшення або зростання діаметру зони затримки росту штамів в порівнянні з контролем у межах 5-15 % розцінювали як недостовірне ($p > 0,05$) [16].

Мікроаерофільні умови культивування створювали у мікроанаеростатах за допомогою газогенеруючих пакетів Generator GENbox microaer (bioMerieux, Франція) або газової суміші, що була виготовлена у заводських умовах і складалась з 5 % O_2 , 10 % CO_2 та 85 % N_2 .

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики, як викладено у посібниках [17-20]. Для аналізу одержаного матеріалу проводилось його групування за атрибутивними та варіаційними ознаками. Для вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів нормальному закону (розподілення Гауса) за критеріями Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уїлка та Ліллієфорса. Якщо розподіл досліджуваних вибірок відрізнявся від нормального, для обробки даних використовували непараметричні критерії: Манна-Уїтні, Краскала-Уолліса,

Вілкоксона, критерій знаків. Достовірність розбіжностей нормально розподілених величин визначали за допомогою критерію t – Стьюденту [17-20]. У результаті зведення матеріалу при підрахунках одиниць спостережень були отримані абсолютні числа, які виражали описові і кількісні ознаки.

Результати та їх обговорення

За даними літератури кількість життєздатних мікробних клітин для штамів, які використовувались у більшості пробіотиків не відповідала заявленій [11, 13, 21, 22]. Тому, проведено вивчення ростових характеристик окремих пробіотичних препаратів.

Встановлено, що досліджені серії пробіотичних засобів не містять в 1 дозі ту кількість живих клітин мікроорганізмів, яка заявлена виробником (згідно інструкціям, 1 доза препаратів має містити не менш ніж 1 млрд. живих лактобактерій). За отриманими результатами, у складі пробіотичних препаратів № 1 та № 2 кількість життєздатних мікробних клітин не відповідала кількості мікроорганізмів, заявленій виробником (табл. 1). Це, з нашої точки зору, може призвести до неефективної дії цих пробіотичних засобів.

Таблиця 1 – Оцінка життєздатності мікробних клітин пробіотичних засобів за аеробних та мікроаерофільних умов культивування

Пробіотичний засіб	lg КУО/мл, (M±m)	
	аеробні умови	мікроаерофільні умови
№ 1	(3,6±0,3)*	(4,3±0,3)*
№ 2	(4,2±0,3)**	(5,6±0,4)**
№ 3	(7,1±0,4)**	(8,8±0,4)**

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

Наступною ланкою досліджень було вивчення впливу умов мікроаерації на ростові властивості вказаних пробіотичних засобів. З'ясовано, що умови газового складу атмосфери культивування суттєво впливали на життєздатність

мікробних клітин пробіотиків: кількість колонієутворюючих одиниць лактобактерій за мікроаерофільних умов культивування збільшувалась в 1,19-1,33 разів, порівняно з аеробними умовами культивування (рис. 1).

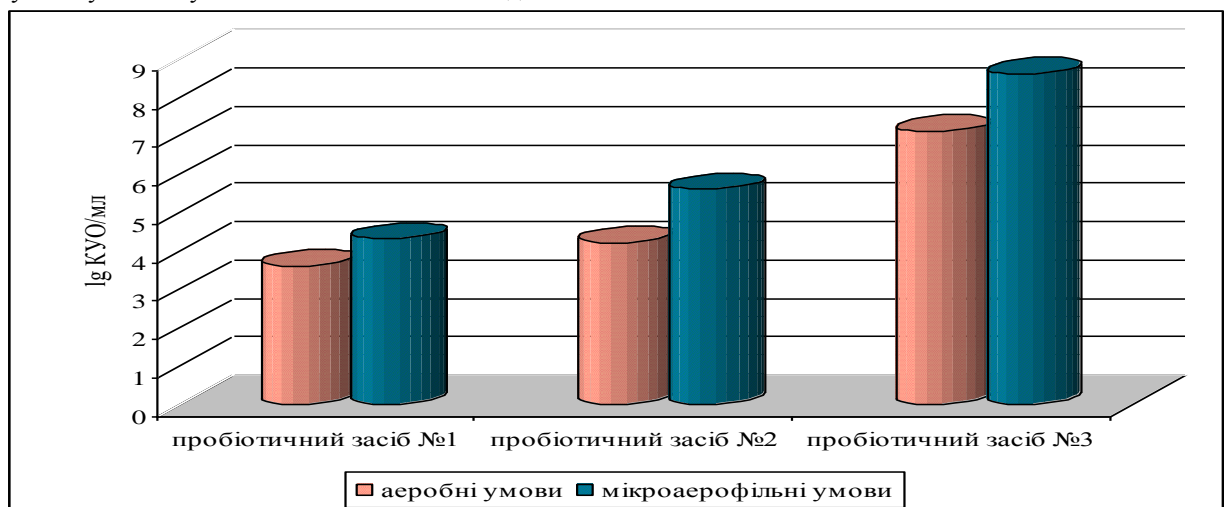


Рис. 1. Ростові властивості пробіотичних засобів за різних умов газового складу атмосфери культивування

Здатність пробіотичних штамів лактобактерій прикріплюватись до епітеліальних клітин людини і розмножуватись, перш ніж клітини слизового шару будуть оновлені, також певною мірою визначає ефективність застосування пробіотичних засобів.

Вивчення адгезивної активності пробіотичних штамів лактобактерій показало, що всі пробіотичні штами лактобактерій незалежно від умов культивування мали високі адгезивні властивості (табл. 2).

Таблиця 2 – Показники адгезії пробіотичних штамів лактобактерій за різних умов культивування

Назва штаму	Умови культивування	Показники адгезії, (M±m)		
		СПА	КА, (%)	IAM
1	2	3	4	5
<i>L. plantarum</i> № 1	аеробні	(5,61±0,38)	(95,4±0,8)	(5,74±0,4)
<i>L. plantarum</i> № 2		(5,72±0,36)	(95,3±0,8)	(5,82±0,42)
<i>L. plantarum</i> № 3		(5,61±0,38)	(95,4±0,8)	(5,76±0,4)
<i>L. acidophilus</i> № 3		(5,63±0,37)	(95,6±0,8)	(5,78±0,41)
<i>L. plantarum</i> № 1	мікроаеро-фільні	(7,53±0,6)	(98,2±1,15)	(7,7±0,6)
<i>L. plantarum</i> № 2		(7,52±0,6)	(98,1±1,15)	(7,66±0,6)
<i>L. plantarum</i> № 3		(7,57±0,6)	(98,4±1,15)	(7,69±0,6)
<i>L. acidophilus</i> № 3		(7,56±0,6)	(98,3±1,15)	(7,68±0,6)

Доцільно відмітити, що всі показники адгезивної активності пробіотичних штамів лактобактерій за мікроаерофільних умов культивування підвищувались ($p < 0,05$).

За результатами проведених досліджень щодо визначення чутливості пробіотичних культур

до антимікробних препаратів встановлено, що газовий склад атмосфери культивування суттєво впливав на резистентність лактобактерій до найбільш поширених в практичній медицині протимікробних засобів (табл. 3).

Таблиця 3 – Чутливість до протимікробних препаратів пробіотичних штамів лактобактерій за різних умов культивування

Назва штаму	Умови культивування	Чутливість до антимікробних препаратів											
		амікацин	цефалексин	цефуроксим	цефотаксим	цефепім	оксацилін	ампіцилін/сульбактам	меропенем	офлоксацин	азітроміцин	лінкоміцин	доксидиклін
<i>L. plantarum</i> № 1	аеробні	с	с	с	с	с	с	ч	ч	ч	ч	с	с
<i>L. plantarum</i> № 2		с	с	с	с	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	с
<i>L. plantarum</i> № 3		с	с	с	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	с
<i>L. acidophilus</i> № 3		с	с	с	с	с	с	ч	ч	ч	ч	с	с
<i>L. plantarum</i> № 1	мікроаерофільні	с	с	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	ч
<i>L. plantarum</i> № 2		с	с	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	ч
<i>L. plantarum</i> № 3		с	с	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	ч
<i>L. acidophilus</i> № 3		с	с	ч	ч	ч	с	ч	ч	ч	ч	с	ч

Примітка. «с» - стійкий, «ч» - чутливий

Одержані дані свідчать, що за аеробних умов культивування всі пробіотичні штами лактобактерій, які досліджувались, були чутливими до представників інгібіторозахищених пеніцилінів (ампіцилін/сульбактам), карбопенемів (меропенем), фторхінолонів (офлоксацин) та макролідів

(азітроміцин). Умови зниженого парціального тиску кисню призводили до зміни антибіотикочутливості лактобактерій. Крім вищезазначених антимікробних засобів пробіотичні штами виявили чутливість й до цефалоспоринових II, III і IV поколінь (цефуроксим, цефотаксим, цефепім) та тетрациклінів (доксидиклін). Імовірно, що таке збільшення

чутливості може сприяти зниженню терапевтичного впливу пробіотичних засобів при їх сумісному прийомі з антибіотиками, особливо в змінених тканинах організму за умов недостатньої аерації.

Висновки

1. Встановлено, що за мікроаерофільних умов культивування пробіотичних препаратів кількість життєздатних мікробних клітин була більшою в 1,19-1,33 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з аеробними умовами.
2. Показники адгезивної активності пробіотичних штамів лактобактерій за умов мікроаерації були вищими, в середньому, в 1,3 рази ($p < 0,05$).
3. З'ясовано, що газовий склад атмосфери культивування суттєво впливав на резистентність до найбільш застосовуваних в практичній медицині протимікробних засобів: за аеробних умов культивування всі пробіотичні штами лактобактерій, були чутливими до інгібіторозахищених пеніцилінів (ампіцилін/сульбактам), карбопенемів (меропенем), фторхінолонів (офлоксацин) та макролідів (азітроміцин); за мікроаерофільних – крім вищевказаних антимікробних засобів пробіотичні штами виявили чутливість й до цефалоспоринових II, III і IV поколінь (цефуроксим, цефотаксим, цефепім) та тетрациклінів (доксидиклін).

References

1. The modern state of development and application of probiotics, prebiotics and synbiotics [Text] / Kalinichenko S.V. [et al.] // Annals of Mechnikov Institute. – 2013. - № 3. – P. 5-12.
2. Bengmark, S. Synbiotic treatment in Clinical Praxis [Text] / S. Bengmark // In: Host Microflora Crosstalk. Old Herborn University Seminar. – 2003. - № 16. – P. 69-82
3. Shenderov, B. A. Probiotics, prebiotics and synbiotics. General and selected fields of problem [Text] / B. A. Shenderov // Food ingredients. Raw materials and additives. – 2005. - № 2. – P. 23-26.
4. Valishev, A.V. Microbial ecology of human gastrointestinal tract [Text] / A. V. Valishev, F. G. Hilmutdinova // Ecology of microorganisms and human / ed. O.V. Bukcharin. – Yekaterinburg: Institute of cell and intracellular, 2006. - P. 169-290.
5. Krasnopolskiy, Yu. M. Probiotics for intestinal disbacteriosis therapy and prevention [Electronic resource]. – Access mode : <http://doctor.itop.net/ArticleItem.aspx?ArticleId=195>
6. Kartashova, O.L. Human skin microflora [Text] / O. L. Kartashova, B. Ya. Usvyatsov // Ecology of microorganisms and human / ed. O.V. Bukcharin. – Yekaterinburg: Institute of cell and intracellular, 2006. - P. 61-102.
7. Yankovskiy, D. S. Microflora and human health [Text] / D. S. Yankovskiy, G. S. Dyment. – K.: «Chervona Ruta-Turs», 2008. – 552 p.
8. Voyda, Yu. V. Microecology of human and role of probiotic preparations in therapy of festering-inflammatory disease in obstetrics and gynecology

[Electronic resource] / Yu V. Voyda, N. L. Solonina // Annals of Mechnikov Institute. – 2012. - № 2. – P. 27-37. – Access mode : http://archive.nbuv.gov.ua/e-journals/AMI/2012_2/12vyvmcr.pdf

9. Medical microbiology, virology and immunology [Text] : [manual for students] : ed. by acad. RAMS A.A. Vorobiov. – M.: MIA, 2004. – 691 p. – 5000 copies. – ISBN 5-89481-209-7.
10. The study of biological properties of the new strains from Lactobacillus genus [Text] / Solovjova I.V. [et al.] // Bulletin of N.I. Lobachevskiy Nizhegorodskiy University. – 2010. - № 2 (2). – P. 462-468.
11. Irkitova, A.N. Ecological-biological description of Lactobacillus strains which are used in probiotics manufacturing [Text] : author's abstract of dissertation PhD in biology: 03.00.07 / Irkitova Alena Nikolaevna ; Institute of ecology and genetics of microorganisms UrO RAS, Perm. – 2012. – 22 p.
12. Kurjata, N.V. Adhesive and immunomodulatory properties of bacteria from Lactobacillus genus [Text] : author's abstract of dissertation ...PhD in biology: 03.00.07 / Kurjata Nina Volodymyrivna ; Odessa I.I. Mechnikov National University. – Odessa, 2005. – 24 c.
13. Dzhoma M.S.X. Comparative characteristic of viability, adhesive, lysozyme and antagonistic activity of the most widely used probiotics [Text] : author's abstract of dissertation ...PhD in medicine: 03.00.07 / Dzhoma Mokchammed Suleiman Khuvyadz ; Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education. – Kharkiv. – 2011. – 24 p.
14. Ryzhkova, T.A. Microbiological characteristic of tonsillar microflora, *Corynebacterium diphtheriae* and peculiarities of microbial interactions under aerobic and microaerophilic conditions [Text] : author's abstract of dissertation ...PhD in medicine: 03.00.07 / Ryzhkova Tetyana Anatoliivna ; SI “Mechnikov IMI AMN of Ukraine”. – Kharkiv, 2009. – 24 p.
15. Brilis V.I. The method for microorganisms' adhesive process determination [Text] / V.I. Brilis, T. A. Brilene, Kch. P. Lentsner, A.A. Lentsner // Laboratory business. – 1986. – № 4. – P. 210–212.
16. Sidorenko, S.V. Antibiotic susceptibility testing: disc-diffusion method. Results interpretation. [Text] / S.V. Sidorenko, E.V. Kolupaev. – M. “Arina”. – 1999. – 33 p. – 1000 copies. – ISBN 5-93235-005-9.
17. Lapach, S.N. Statistical methods in medicobiological investigations using Excel [Text] / S.N. Lapach, A.V. Chubenko, P.N. Babych. – K. : Morion, 2000. – 320 p. – ISBN 966-7632-16-4.
18. Borovikov, V.P. Statistica. Statistical analysis and data processing in OS Windows [Text] / V.P. Borovikov, I.P. Borovikov. – M. : Filin, 1998. – 592 p.
19. Applied medical statistics [Text] / [ed. by V.M. Zaitsev, V.G. Liflianskiy]. – StP. : I.I. Mechnikov StPMA, 2000. – 299 p.
20. Gelman, V. Ya. Medical informatics: practical application [Text] / V. Ya. Gelman. – StP. : Piter, 2002. – 480 p.
21. Solonina, N. L. Viability and adhesive properties of bacteria probiotic strains from the lyophilized

commercial probiotics which are used in practice [Text] / N. L. Solonina. – Annals of Mechnikov Institute. – 2013. - № 1. – P. 61-65.

22. Immunomodulatory activity of lacto- and bifidobacteria probiotic strains in vitro and in vivo [Text] / L. M. Lazarenko [et al.] // Theses of XIIIth congress of Vynohrad'skyj Society of Microbiologists of Ukraine. – Yalta, 2013. – P. 278.

УДК 579.864.1:57.042:579.24

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS SPP.* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ЇХ В АЕРОБНИХ ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНИХ УМОВАХ

Бабич Є. М., Калініченко С. В., Коротких О. О., Рижкова Т. А., Скляр Н. І., Маслій І. Г., Балак А. К., Шкодовська Н. Ю., Багача М. Б.

Вивчено біологічні властивості (ростові якості, адгезивну активність та чутливість до антимікробних препаратів) пробіотичних штамів лактобактерій за різних умов газового складу атмосфери культивування. Встановлено, що кількість життєздатних клітин лактобактерій у 1 дозі досліджених серій пробіотичних засобів нижче за показник, заявлений виробником. Умови газового складу атмосфери культивування суттєво впливають на життєздатність мікробних клітин пробіотиків: кількість колонієутворюючих одиниць лактобактерій за мікроаерофільних умов культивування збільшується в 1,19-1,33 рази, порівняно з аеробними умовами культивування. Доведено, що за умов мікроаерації також підвищуються показники адгезивної активності пробіотичних штамів лактобактерій та чутливість до цефалоспоринів II, III і IV поколінь (цефуроксим, цефотаксим, цефепім) та тетрациклінів (доксациклін). Зміни біологічних властивостей лактобактерій за різних умов потребують подальшого вивчення та повинні бути враховані при оптимізації схем корекції дисбіотичних порушень.

Ключові слова: пробіотичні штами, лактобактерії, адгезивні властивості, ростові властивості, антибіотикочутливість.

УДК 579.864.1:57.042:579.24

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS SPP.* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ИХ В АЭРОБНЫХ И МИКРОАЭРОФИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Бабич Е. М., Калиниченко С. В., Коротких Е. О., Рыжкова Т. А., Скляр Н. И., Маслий И. Г., Балак А. К., Шкодовская Н. Ю., Багача М. Б.

Изучены биологические свойства (ростовые характеристики, адгезивная активность и чувствительность к противомикробным препаратам) пробиотических штаммов лактобактерий при разных условиях газового состава атмосферы культивирования. Установлено, что количество жизнеспособных клеток лактобактерий в 1 дозе исследованных серий пробиотических препаратов

ниже показателя, заявленного производителем. Условия газового состава атмосферы культивирования существенно влияют на жизнеспособность клеток пробиотиков: количество колониеобразующих единиц лактобактерий при микроаэрофильных условиях культивирования увеличивается в 1,19-1,33 раз, по сравнению с аэробными условиями. Доказано, что при условиях микроаэрации также повышаются показатели адгезивной активности пробиотических штаммов лактобактерий и чувствительность к цефалоспорином II, III, IV поколений (цефуроксим, цефотаксим, цефепим) и тетрациклином (доксациклін). Изменение биологических свойств лактобактерий при разных условиях культивирования требуют дальнейшего изучения и должны быть учтены при оптимизации схем коррекции дисбиотических нарушений.

Ключевые слова: пробиотические штаммы, лактобактерии, адгезивные свойства, ростовые качества, антибиотикочувствительность.

UDC 579.864.1:57.042:579.24

THE STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF PROBIOTIC *LACTOBACILLUS SPP.* STRAINS UNDER AEROBIC AND MICROAEROPHILIC CULTIVATION CONDITIONS

Babych E.M., Kalinichenko S.V., Korotkykh O.O., Ryzhkova T.A., Sklyar N.I., Maslii I.G., Balak A. K., Shkodovska N. Yu., Bagacha M. B.

The biological properties (growth characteristics, adhesive activity and sensitivity to antimicrobial) of probiotic *Lactobacillus* strains were studied under different gas composition of incubation atmosphere. It was found that the number of viable lactobacilli cells in the one dose of investigated probiotic preparations was lower than it was claimed by the manufacturer. Gas composition of incubation atmosphere affects cell viability of probiotic strains. The number of colony forming units of lactobacilli under microaerophilic conditions increased in 1,19-1,33 times as compared with aerobic conditions. It was proved that adhesive activity of probiotic *Lactobacillus* strains and sensitivity to 2th, 3th, 4th generations of cephalosporins (cefuroxime, cefotaxime, cefepime) and tetracyclines (doxycycline) also increased under microaerophilic conditions. The changes of the biological properties of lactobacilli under different cultivation conditions require further study for optimization of correction of dysbiotic disorders.

Key words: probiotic strains, lactobacteria, adhesive properties, growth characteristics, susceptibility to antibiotics.