

**Н.К. Коваленко, О.П. Лівінська, О.А. Полтавська, І.Л. Гармашева,
Л.М. Шинкаренко, Л.Т. Олещенко**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна*

ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ І БІФІДОБАКТЕРІЙ

Із зразків сухої мікробної субстанції “Vivolac” виділено, ідентифіковано та вивчено біологічну активність молочнокислих бактерій та біфідобактерій. Встановлено, що молочнокислі бактерії були представлені видами *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. paracasei*. Біфідобактерії належали до виду *Bifidobacterium animalis*. Показано, що адгезивна активність досліджуваних штамів залежала від їх родової належності: лактобацили виявили середню адгезивність до букального епітелію (СПА 2,07-2,26), а біфідобактерії – високу (СПА 4,11-4,76). Антагонізм щодо умовно патогенних тест-культури найбільше проявлявся стосовно *Pseudomonas aeruginosa*. Лактобацили і біфідобактерії проявляли стійкість до аміноглікозидів. Чутливість досліджуваних штамів до антибіотиків не залежала від роду і виду мікроорганізму. Штами лактобацил і біфідобактерій були здатні до виживання в шлунковому соці і при різних концентраціях жовчі, що вказує на перспективність створення на їх основі пробіотичних препаратів.

Ключові слова: пробіотичні властивості, лактобактерії, біфідобактерії.

Фундаментальними і прикладними дослідженнями в останні роки показана визначальна роль для здоров'я людини представників корисної мікрофлори – молочнокислих бактерій і біфідобактерій. Ці групи мікроорганізмів вводять до складу пробіотиків, біологічно активних добавок і продуктів функціонального харчування. В сучасний період розширилася сфера виробництва пробіотиків на основі штамів лактобацил і біфідобактерій. Разом із тим стали жорсткішими вимоги до таких препаратів щодо забезпечення ефективності і безпечності їх вживання. Згідно з стандартами ВООЗ, повинна проводитись чітка ідентифікація пробіотичних штамів, вони мають бути генетично стабільними та здатними виживати в умовах шлунково-кишкового тракту (ШКТ), а саме: за низьких значень рН, дії травних ферментів та жовчних кислот. Крім того, пробіотичні культури повинні бути здатними до адгезії, проявляти антагоністичну активність стосовно патогенних мікроорганізмів, бути безпечними та не мати побічних дій на макроорганізм.

Метою даної роботи було визначити видовий склад молочнокислих бактерій та біфідобактерій, які входять до складу сухої мікробної субстанції “Vivolac” та дослідити їх біологічні властивості.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були 5 зразків мікробної субстанції, що містили різні види молочнокислих бактерій та біфідобактерій. Субстанції були одержані від компанії «Vivolac Cultures Corporation» (Індіана, США).

Виділення монокультур молочнокислих бактерій проводили на середовищі МРС, а біфідобактерій – на МРС з 0,5 % цистеїну. Для визначення родової належності виділених штамів використовували традиційні мікробіологічні методи, які включали дослідження морфолого-культуральних ознак, а також фізіолого-біохімічних властивостей. Це дало змогу попередньо визначити видову належність ізольованих культур.

Остаточну ідентифікацію штамів лактобацил та біфідобактерій до виду проводили за спектром ферментації вуглеводів. Для цього використовували тест-системи для ідентифікації мікроорганізмів API 50CH (Bio Mérieux, Inc, France), аналіз проводили згідно з рекомендаціями виробника. Результати біохімічного тестування з використанням тест-системи API 50CH обробляли за допомогою програми API-Web, яка виявляла відсоток ідентичності певному виду.

Здатність бактерій до адгезії вивчали на клітинах букального епітелію людини розгорнутим методом [1]. Бактеріальні клітини вирощували протягом доби, після чого центрифугували 5 хв. при 3000 об/хв. Одержану біомасу ресуспендували в буфері PBS наступного складу (г/100 мл): NaCl – 0,85; Na₂HPO₄ – 1,42 (рН 7,2-7,3). Одержували суспензію бактерій, яка містила 10⁹ КУО/мл за стандартом мутності McFarland. Зразок букального епітелію переносили в буфер, епітеліоцити центрифугували при 300 об/хв, супернатант видаляли, а одержаний

© Н.К. Коваленко, О.П. Лівінська, О.А. Полтавська, І.Л. Гармашева, Л.М. Шинкаренко, Л.Т. Олещенко, 2010

осад знову ресуспендували у буфері та центрифугували у такому ж режимі. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Готували суспензію епітеліальних клітин у концентрації 10^8 клітин/мл. Одержані суспензії бактеріальних та епітеліальних клітин змішували у рівних об'ємах в мікропробірці та інкубували при температурі 37 °С протягом 30 хв. Після закінчення експозиції клітини двічі промивали буфером PBS 5 хв. при 200 об/хв, щоб звільнити епітеліоцити від неприкріплених бактерій. З осаду клітин готували мазки, фарбували за Грамом і підраховували кількість адгезованих до епітеліоцитів клітин. Визначали середній показник адгезії, а саме – середню кількість бактерій, що прикріпились до однієї епітеліальної клітини (СПА). Також вираховували коефіцієнт участі епітеліальних клітин в адгезивному процесі (К) – процент клітин, які мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми. Індекс адгезивності мікроорганізму (ІАМ) – середню кількість бактерій на одній епітеліальній клітині, що бере участь у процесі адгезії, – визначали за формулою: $ІАМ = (СПА \cdot 100) / К$. Адгезивність вважалась нульовою при $СПА = 0-1,0$; низькою при $СПА = 1,01-2,0$; середньою – при $2,01-4,0$ та високою – вище 4,0. Мікроорганізм вважався неадгезивним при $ІАМ \leq 1,75$; низькоадгезивним – при показниках 1,76-2,50; середньоадгезивним – від 2,51 до 4,00 та високоадгезивним при $ІАМ > 4,00$.

Антагоністичні властивості лактобацил та біфідобактерій вивчали стосовно 8 референтних штамів умовно патогенних мікроорганізмів: *Pseudomonas aeruginosa* В-900 (АТСС 9027), *Proteus vulgaris* В-905 (АТСС 6896), *Escherichia coli* В-906 (АТСС 25922(F-50)), *Bacillus cereus* В-908 (АТСС 11778), *Staphylococcus aureus* В-904 (АТСС 25923(F-49)), *Staphylococcus epidermidis* В-919 (АТСС 12228), *Klebsiella pneumoniae* В-920 (АТСС 10031), *Salmonella enterica var. Abony* В-921 (NCTC 6017). Дослідження проводили з використанням методу відстроченого антагонізму [2].

Дослідження антибіотикорезистентності бактеріальних культур проводили диско-дифузійним методом [3] з використанням стандартних дисків з антибіотиками виробництва НДЦФ (м. Санкт-Петербург, Росія). Інтерпретацію ступеня чутливості до антимікробних препаратів проводили за діаметрами зон затримки росту досліджуваних штамів, згідно з рекомендаціями виробника дисків.

З метою вивчення стійкості досліджуваних штамів до дії шлункового соку 1,5 мл добової культури центрифугували при 3 тис. об/хв протягом 5 хв, відмивали у фізіологічному розчині і знову центрифугували. Осад ресуспендували в 1,5 мл шлункового соку (рН 2.0) (ЗАТ “Біофарма”, Україна) та інкубували 2 год при температурі 37 °С. Ступінь виживання бактерій визначали на MRS-агарі врахуванням кількості КУО через 48 год інкубації при 37 °С [7, 11]. У контролі замість шлункового соку використовували фізіологічний розчин того самого об'єму.

Толерантність до дії жовчі визначали, використовуючи як основу MRS-агар для лактобацил та MRS-агар із 0,5 % цистеїну для біфідобактерій, у які додавали жовч у кількості 0,3 %. Кожен штам вирощували при температурі 37 °С. Якщо на поверхні агару був ріст, відбирали колонії і засівали ними рідке середовище MRS з жовчю [4, 8, 11].

Усі дослідження повторювали тричі. Статистичну обробку результатів проводили за традиційними методами варіаційної статистики з використанням програми Excel.

Результати та їх обговорення. До складу зразків концентратів сухої мікробної субстанції “Vivolac”, за даними виробника, входили такі види мікроорганізмів: 1-й зразок – *L. acidophilus*, 2-й зразок – *L. bulgaricus*, 3-й зразок – *L. casei*, 4-й зразок – *B. longum*, 5-й зразок – *B. bifidum*. З метою уточнення таксономічного положення цих видів нами була проведена реідентифікація ізольованих монокультур на рівні роду і виду.

Лактобацили за морфологією відповідали видам *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* і *L. casei*. Біфідобактерії за морфологією являли собою дрібні палички довжиною 1–4 мкм, розташовані по 1–2 клітини чи скупченням, але вони не були подібні видам *B. longum* і *B. bifidum*, як це було зазначено на зразках.

Досліджувані штами монокультур лактобацил метаболізували глюкозу, фруктозу, маннозу, ескулін, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу. Не засвоювали: гліцерин, еритрит, D- та L-арабінозу, D- та L-ксилозу, β-метил-D-ксилозид, мелібіозу, рамнозу. За результатами АРІ-тестування монокультура *L. casei*, яка ізольована зі зразка, була ідентифікована як *L. paracasei*, оскільки вона метаболізувала також маніт, арабінозу, туранозу, сорбіт, арбутін,

D-лікозу, D-тагату, N-ацетил-глюкозамін, галактозу і повною мірою зброджувала лактозу. Коефіцієнт подібності ID з *L. paracasei* дорівнював 99,0 %.

Ідентифікація монокультури *L. acidophilus* підтвердила її належність до даного виду, цей штам засвоював N-ацетил-глюкозамін, галактозу, рафінозу. Коефіцієнт подібності ID з *L. acidophilus* був 95,6 %.

Культура *L. bulgaricus* з досліджуваних цукрів метаболізувала лише глюкозу, фруктозу й лактозу, що притаманно даному виду. Слід зазначити, що за сучасною систематикою вид *L. bulgaricus* носить назву *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Коефіцієнт ID подібності дорівнював 99,7 %.

Досліджувані штами роду *Bifidobacterium* засвоювали галактозу, глюкозу, фруктозу, мелібіозу, цукрозу та рафінозу, а також – лактозу і саліцин, але не метаболізували глюкозат, гліцерин, еритрит, D-арабінозу, L-ксилозу, адоніт, β-метил-D-ксилозид, сорбозу, рамнозу, дульцит, інозит, маніт, сорбіт, β-метил-D-манозид, β-метил-L-манозид, N-ацетил-глюкозамін, арбутін, трегалозу, ксиліт, D-лікозу, D-тагату, D- фукозу, D-арабітол, 2-кето-глюкоанат і були ідентифіковані як *B. animalis*.

Наявність адгезивних властивостей у пробіотичних культур є одним із критеріїв їх ефективності у складі біопрепаратів [5]. Внаслідок проведених досліджень виявилось, що всі штами здатні адгезувати до букального епітелію людини (табл. 1). Штами *L. acidophilus* та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* були віднесені до середньоадгезивних, оскільки показники адгезії (СПА) дорівнювали $2,26 \pm 0,15$ і $2,07 \pm 0,57$, відповідно (рис. 1а, б). СПА біфідобактерій виявилися високими (*B. animalis B* $4,76 \pm 1,45$ та *B. animalis L* $4,11 \pm 0,99$). Найвищий СПА серед досліджуваних штамів був у *L. paracasei* - $6,74 \pm 1,94$ (рис. 1в, табл. 1). У *L. paracasei* та *B. animalis B* коефіцієнт участі епітеліоцитів у адгезії виявився найбільшим і складав $91,3 \pm 5,24$ % та $91,33 \pm 6,17$ %, відповідно.

Таблиця 1

Адгезивні властивості лактобацил та біфідобактерій до клітин букального епітелію людини

Досліджуваний штам	Середній показник адгезії (СПА)	Коефіцієнт участі епітеліоцитів К, %	Індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ)
<i>L. acidophilus</i>	$2,26 \pm 0,15$	$86,30 \pm 0,67$	$2,61 \pm 0,16$
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	$2,07 \pm 0,57$	$77,67 \pm 8,35$	$2,58 \pm 0,51$
<i>L. paracasei</i>	$6,74 \pm 1,94$	$91,30 \pm 5,24$	$7,18 \pm 1,75$
<i>B. animalis B</i>	$4,76 \pm 1,45$	$91,33 \pm 6,17$	$5,07 \pm 1,32$
<i>B. animalis L</i>	$4,11 \pm 0,99$	$87,00 \pm 4,16$	$4,66 \pm 0,94$

Примітка: $p < 0,05$

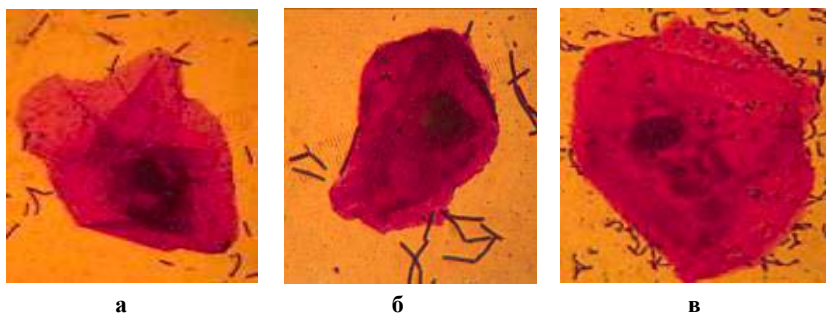


Рис 1. Адгезія лактобацил на клітинах букального епітелію людини

а – *L. acidophilus*, б – *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, в – *L. paracasei*

Таблиця 2

Антагоністична активність досліджуваних штамів біфідобактерій та лактобацилл

Штам	Зона затримки росту тест-культур, мм									
	грампозитивні					грамнегативні				
	<i>S. aureus</i> B-904 (ATCC 25923 (F-49))	<i>S. epidermidis</i> B-919 (ATCC 12228)	<i>B. cereus</i> B-908 (ATCC 11778)	<i>R. aeruginosa</i> B-900 (ATCC 9027)	<i>R. vitigalis</i> B-905 (ATCC 6896)	<i>E. coli</i> B-906 (ATCC 25922 (F-50))	<i>K. pneumoniae</i> B-920 (ATCC 10031)	<i>S. enterica</i> var. <i>Abony</i> B-921 (NCTC 6017)		
<i>B. animalis</i> B	0	4,33±0,44	0	7,00±0,67	0	2,33±0,44	4,00±0,67	5,00±0,00		
<i>B. animalis</i> L	0	0	7,33±0,56	0	0	0	0	2,00±0,00		
<i>L. acidophilus</i>	0	2,00±0,00	6,00±0,67	2,33±0,44	15,00±0,67	0	2,33±0,44	0		
<i>L. paracasei</i>	0	3,33±0,44	3,00±0,67	6,00±0,00	15,33±0,44	0	0	3,66±0,44		
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	15,0±0,67	16,00±0,67	3,33±0,44	4,00±0,67	15,66±0,44	2,66±0,44	0	3,33±0,44		

Примітка: $p < 0,05$

Із наведених у табл. 1 даних видно, що адгезивна активність залежала від виду мікроорганізму. Аналогічні результати були одержані іншими дослідниками, вони показали, що штами *L. casei* проявляли вищі адгезивні показники, ніж штами інших видів [10]. Крім того, автори дослідили, що здатність до адгезії це не лише видова, а й штамозна ознака [9]. Здатність даних штамів активно адгезувати до епітеліальних клітин людини, на наш погляд, можна пояснити тим, що ці мікроорганізми є природними симбіонтами організму ссавців і у великій кількості присутні у кишечнику людини.

При дослідженні антагоністичних властивостей біфідобактерій та лактобацил було встановлено, що досліджувані культури проявляли різний ступінь пригнічуючої дії стосовно різних штамів умовно патогенних мікроорганізмів (табл. 2). Так, штам *B. animalis B* проявив найбільшу активність щодо *P. aeruginosa* (розмір зони затримки росту був $7,0 \pm 0,67$ мм), меншу – до *K. pneumoniae*, *S. enterica* var. *Abony*, *E. coli* (зони затримки росту $4,0 \pm 0,67$, $5,0 \pm 0,2,33 \pm 0,44$ мм, відповідно). У той же час стосовно *B. cereus*, *S. aureus*, *P. vulgaris* інгібуючої дії не спостерігалось. *B. animalis L* пригнічував лише ріст *B. cereus* та *S. enterica* var. *Abony* (розміри зон затримки росту тест-культур $7,33 \pm 0,56$ та $2,0 \pm 0$ мм відповідно). Штам *L. acidophilus* проявив істотну пригнічуючу дію стосовно *P. vulgaris* та *B. cereus* (величина зон затримки росту $15,0 \pm 0,67$ та $6,0 \pm 0,67$ мм відповідно). У той же час, величина зон затримки росту *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* та *K. pneumoniae* була лише в межах 2 мм. Не спостерігалось інгібуючої дії до решти трьох тест-культур. При дослідженні антагоністичних властивостей *L. paracasei* інгібуючий ефект був відмічений щодо *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *B. cereus*, *S. epidermidis*, *S. enterica* var. *Abony* ($6,0 \pm 0$, $15,33 \pm 0,44$, $3,0 \pm 0,67$, $3,33 \pm 0,44$ та $3,66 \pm 0,44$ мм відповідно) і не проявлявся щодо *S. aureus*, *E. coli* і *K. pneumoniae*. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* гальмував ріст практично всіх тест-культур – *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus* та *S. enterica* var. *Abony* (розміри зон затримки росту коливались в межах 2-4 мм), *S. aureus*, *P. vulgaris*, *S. epidermidis* (зони затримки росту $15,0 \pm 0,67$, $15,66 \pm 0,44$, $16,0 \pm 0,67$ мм відповідно). В той же час даний штам не пригнічував ріст *K. pneumoniae*.

З одержаних даних видно, що найбільшу антагоністичну активність щодо умовно патогенних мікроорганізмів проявив штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, найменшу – штам *B. animalis L*, який пригнічував ріст лише *B. cereus* та *S. enterica* var. *Abony*.

Слід зазначити, що всі досліджувані штами лактобацил, на відміну від біфідобактерій, проявили доволі високий ступінь антагонізму щодо *P. vulgaris*.

Оскільки пробіотичні препарати часто використовуються на фоні антибіотикотерапії, було актуальним вивчити чутливість досліджуваних монокультур лактобацил і біфідобактерій до антибіотиків.

Встановлено, що штами біфідобактерій виявилися чутливими до всіх інгібіторів синтезу клітинної стінки, окрім цефтибутену, до якого *B. animalis L* був стійким (табл. 3). Лактобацили також проявили чутливість до більшості антибіотиків даного ряду, але штам *L. paracasei* був стійким до ванкоміцину та цефтибутену, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* – до цефтазидиму. Окрім цього, всі штами лактобацил виявилися стійкими до цефепіму.

Антибіотики – інгібітори синтезу білка проявляли різну активність щодо досліджуваних культур. Штами біфідобактерій і два штами лактобацил були стійкими до аміноглікозидних антибіотиків, що зумовлено їх переважно анаеробним типом метаболізму [6]. Лише *L. paracasei* був чутливим до нетілміцину.

Нітрофуранові препарати проявляли різну дію. Всі штами – *B. animalis B*, *L. paracasei*, *L. acidophilus* та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* виявилися стійкими до фузидину.

Інгібітори транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот також у різній мірі впливали на досліджувані штами. Вони були чутливі до дії рифампіцину та офлоксацину. *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *B. animalis L* були стійкі до ломефлоксацину та норфлоксацину. *L. paracasei* та *B. animalis B* виявили проміжну чутливість до ломефлоксацину.

Таким чином, досліджувані штами лактобацил і біфідобактерій виявилися чутливими до широкого спектру антимікробних препаратів. Найбільш стійкими до дії досліджуваних препаратів виявився штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, який, на відміну від інших штамів, був резистентний до цефтазидиму, цефепіму та фурадоніну.

Отже, чутливість досліджуваних штамів до антибіотиків мала штамоспецифічний характер і не залежала від роду і виду мікроорганізму, що підтверджує дані літератури [6].

Вплив антибіотиків на життєздатність лактобацил та біфідобактерій

Механізм дії	Антибіотик	<i>L. paracasei</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i>	<i>B. animalis B</i>	<i>B. animalis L</i>
Інгібітори синтезу клітинної стінки	Бензилпеніцилін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Оксацилін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Ампіцилін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Карбеніцилін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Піперацилін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Іміпенем	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Ванкоміцин	С	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефалотин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефалексин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефалоклор	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефотаксим	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефтріаксон	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Цефтазидим	Ч	Ч	С	Ч	Ч
	Цефепім	С	С	С	Ч	Ч
Цефтибутен	С	Ч	П	Ч	С	
Інгібітори синтезу білка	Гентаміцин	С	С	С	С	С
	Тобраміцин	С	С	С	С	С
	Сизоміцин	С	С	С	С	С
	Амікацин	С	С	С	С	С
	Нетілміцин	Ч	С	С	С	С
	Лінкоміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Кліндаміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Еритроміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Азитроміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Олеандоміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Рокситроміцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Тетрациклін	Ч	Ч	П	Ч	Ч
	Доксициклін	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч
	Фузидин	С	С	С	С	С
Фурадонін	Ч	Ч	С	Ч	Ч	
Хлорамфенікол	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч	
Інгібітори транскрипції і с-зу нуклеїнових кислот	Офлоксацин	Ч	Ч	П	Ч	Ч
	Ломефлоксацин	П	С	С	П	С
	Норфлоксацин	Ч	С	С	Ч	С
	Рифампіцин	Ч	Ч	Ч	Ч	Ч

Примітка: "Ч" – чутливий до антибіотику, "П" – помірно стійкий, "С" – стійкий

Окремою частиною вивчення властивостей бактерій, перспективних для використання у складі пробіотиків, є дослідження їх здатності виживати в умовах шлунку, а саме за низьких значень рН та дії шлункових ферментів.

Результати досліджень представлені у табл. 4. Як видно з таблиці, кількість клітин штаму *B. animalis B* при двогодинному витримуванні у шлунковому соці зменшувалась трохи більше, як на два порядки – з $5,0 \cdot 10^7$ до $1,5 \cdot 10^5$ КУО/мл. Концентрація клітин *B. animalis L* знижувалась із $9,0 \cdot 10^7$ до $3 \cdot 10^4$ КУО/мл. Після витримування у шлунковому соці *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* життєздатні клітини цих штамів були відсутні.

Таблиця 4

Вживання лактобацил і біфідобактерій після двогодинного витримування у шлунковому соці

	Початкова кількість клітин у суспензії (КУО/мл)	Кількість клітин у суспензії (КУО/мл) у контрольних зразках	Кількість клітин у суспензії (КУО/мл) після обробки шлунковим соком
<i>L. paracasei</i>	$1,8 \pm 0,51 \cdot 10^7$	$1,7 \pm 0,24 \cdot 10^7$	0
<i>L. acidophilus</i>	$1,4 \pm 0,14 \cdot 10^7$	$1,0 \pm 0,14 \cdot 10^7$	0
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	$3,0 \pm 0,41 \cdot 10^7$	$1,7 \pm 0,11 \cdot 10^7$	0
<i>B. animalis B</i>	$5,0 \pm 0,11 \cdot 10^7$	$4,5 \pm 0,52 \cdot 10^7$	$1,5 \pm 0,24 \cdot 10^5$
<i>B. animalis L</i>	$9,0 \pm 0,41 \cdot 10^7$	$9,0 \pm 0,51 \cdot 10^7$	$3,0 \pm 0,17 \cdot 10^4$

Примітка: $p < 0,05$

Як видно з одержаних даних, лише штами біфідобактерій більшою чи меншою мірою залишалися життєздатними після витримування у шлунковому соці. Багато авторів вказують на доволі виражену кислотостійкість біфідобактерій, що здатні витримувати рН 2,5-3 [8, 11]. З іншого боку, жоден із штамів лактобацил, які теж є кислотостійкими мікроорганізмами, не виявив стійкості до дії шлункового соку.

Не менш важливим питанням є вивчення здатності до виживання в присутності жовчі. Дані літератури вказують на різні концентрації жовчних кислот, до яких бактерії, що входять до складу пробіотиків, повинні бути стійкими, але більшість авторів схиляється до думки, що такою кількістю є 0,15 – 0,3 % [4, 11]. Нами спочатку було досліджено здатність бактерій виживати в присутності 0,3 % жовчі, а потім визначено її інгібуючі концентрації для кожного штаму.

Результати дії жовчі на бактерії родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* подано в табл. 5. Було показано, що з п'яти штамів лише один – *B. animalis B* був здатним слабко рости в середовищі із 0,3 % жовчі. У решти штамів росту не було виявлено.

Таблиця 5

Ріст лактобацил і біфідобактерій на середовищах із різними концентраціями жовчі

штам	концентрація жовчі, %											
	0		0,1		0,15		0,2		0,25		0,3	
	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P	A	P
<i>L. paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	±	+	-	-	-	-	-	-
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis B</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±
<i>B. animalis L</i>	+	+	+	±	+	-	±	-	-	-	-	-

Примітка: А – агаризоване середовище; Р – рідке середовище

Результати вивчення росту досліджуваних штамів на середовищах із меншими концентраціями жовчі показали, що *L. paracasei* виявив здатність росту в присутності 0,2 % жовчі, *L. acidophilus* – 0,15 %, *B. animalis B* – 0, 25%. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* показав слабкий ріст при концентрації 0,1 % на агаризованому середовищі, але не виявив росту при тій же концентрації в MRS-бульйоні. *B. animalis L* був стійкий до 0,1 %, а також виявив слабкий ріст на агаризованому середовищі із концентраціями жовчі 0,15 % і 0,2 %. Одержані дані свідчать, що найбільш стійким до дії жовчі виявився штам *B. animalis B*, який ріс при концентрації жовчі 0,3 %. Найменш стійким був штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, що показав слабкий ріст лише при концентрації 0,1 % жовчі.

Згідно з літературними даними, стійкість до дії жовчних кислот спостерігається переважно у бактерій, виділених із ШКТ ссавців, і може не проявлятися у штамів, виділених із інших джерел, наприклад, кисломолочних продуктів [4]. Це пояснюється тим, що наявність жовчних кислот у середовищі існування є природним для штамів молочнокислих бактерій – представників шлунково-кишкового тракту ссавців.

Таким чином, в субстанціях, що містили лактобацили і бифідобактерії, виявлені види роду *Lactobacillus* – *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* і *L. paracasei* та роду *Bifidobacterium* – *B. animalis B*, *L.*

Усі досліджувані культури по-різному проявляли біологічну активність: здатність до адгезії, антагонізм щодо умовно патогенних мікроорганізмів, чутливість до антибіотиків. Вони здатні виживати в шлунковому соці та при різних концентраціях жовчі, що робить їх перспективними для створення пробіотичних препаратів.

**Н.К. Коваленко, О.П. Ливинская, О.А. Полтавская, И.Л. Гармашева,
Л.М. Шинкаренко, Л.Т. Олещенко**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ

Резюме

Из образцов сухой микробной субстанции “Vivolac” выделены и идентифицированы штаммы молочнокислых бактерий и бифидобактерий. Установлено, что молочнокислые бактерии были представлены видами *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. paracasei*. Бифидобактерии относились к виду *Bifidobacterium animalis*. Изучено проявление биологической активности всех исследованных штаммов. Показано, что адгезивная активность исследованных штаммов зависела от родовой принадлежности штаммов: лактобациллы проявили среднюю адгезивность к буккальному эпителию (СПА 2,07-2,26), а бифидобактерии – высокую (СПА 4,11-4,76). Антагонизм по отношению к условно патогенным тест-культурам в большей степени проявлялся по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*. Лактобациллы и бифидобактерии проявляли устойчивость к аминокликозидам. Чувствительность исследуемых штаммов к антибиотикам не зависела от рода и вида микроорганизма. Штаммы лактобацилл и бифидобактерий были способны к выживанию в желудочном соке и при разных концентрациях желчи, что указывает на перспективность создания на их основе пробиотических препаратов.

Ключевые слова: пробиотические свойства, лактобактерии, бифидобактерии.

**N.K.Kovalenko, O.P.Livinska, O.A.Poltavska,
I.L.Garmasheva, L.M.Shinkarenko, L.T.Oleshchenko**

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

PROBIOTIC PROPERTIES OF INDUSTRIAL STRAINS OF LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA

S u m m a r y

Lactic acid bacteria and bifidobacteria were isolated from the samples of dry microbial substance “Vivolac” and identified. The lactic acid bacteria were identified as *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. paracasei*. Bifidobacteria belonged to the species *Bifidobacterium animalis*. Manifestation of biological activity of all studied strains was investigated. It was shown, that adhesive activity of the studied

strains depended on the genus of the strain: lactobacilli manifested medium adhesiveness to buccal epithelium (medium adhesive index 2.07-2.26), bifidobacteria manifested high adhesiveness (medium adhesive index 4.11-4.76). Antagonism against pathogenic and opportunistic reference strains was manifested to a greater extent to *Pseudomonas aeruginosa*. Lactobacilli and Bifidobacteria were resistant to aminoglycosides. Sensitivity of the studied strains to antibiotics did not depend on the genus and species of microorganism. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains were capable to survive in gastric juice and at different concentration of bile, which is promising for development of probiotic preparations on the basis of these strains.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: probiotic properties, lactobacilli, bifidobacteria.

The author's address: Kovalenko N.K., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine: 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Брилис В.К., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. - 1986. - № 4. - С. 210-212.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. - Москва.: Высш. Шк., 1986. - 448 с.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.-1890-04) // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер., - 2004. - 6, № 4. - С. 306-359.
4. Chou L.S., Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus* // J. Dairy Sci. - 1999. - 82, N 1. - P. 23-31.
5. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. - London, 2002. - P. 3-56.
6. Jaana M., Angela H., Konrad J. Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the E-test method // Int. Dairy J. - 2007. - N 17. - P. 1123-1131.
7. Kos B., Suskovic J., Goreta J., Matosic S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions // Food Technol. Biotechnol. - 2000. - 38, N 2. - P. 121-127.
8. Liu Z., Jiang Z., Zhou K. Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract // Food Microbiol. - 2007. - 13, N 5-6. - P. 215-219.
9. Tallon R., Arias S., Bressollier P. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds // J. Appl. Microbiol. - 2007. - 102, N 2. - P. 442-451.
10. Tuomola M.E., Seppo J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures // Int. J. Food Microbiol. - 1998. - 41, N 1. - P. 45-51.
11. W. Yazid A., Shuhaimi M., Ghazali M. Survival of bifidobacteria in simulated gastric pH and growth in the presence of bile // Asia J. Mol. Biol. Biotechnol. - 1999. - 7, N2. - P. 185-188.

Отримано 17.01.2008