

Ю.М. Похилько, Н.О. Кравченко

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва
НААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,
тел.: +38 (046) 223 17 49, e-mail: pohilko.yura@gmail.com

СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS* ДО МЕТАБОЛІТІВ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ

Мета. Метою даної роботи було визначити вплив рН метаболітів травної системи на активність росту молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів. **Методи.** У роботі використано 11 штамів молочнокислих бактерій, виділених з шлунково-кишкового тракту кролів. Стійкість бактерій до метаболітів травної системи визначали шляхом їх культивування в середовищі MRS з жовчю, гідроген хлоридом, натрій хлоридом, фенолом. **Результати.** Встановлено, що досліджувані штами виживали при рН середовища 4,0–9,0. Всі штами мали високу стійкість до концентрації жовчі (20, 40%), гідроген хлориду (3%), натрій хлориду (5%), фенолу (0,5%), кількість життєздатних клітин – 103–105 КУО/мл після 48 год культивування. **Висновки.** Встановлено, що досліджувані штами лактобацил були стійкими до високих концентрацій жовчі та фенолу, 70% – до низьких значень рН, 50% – до натрій хлориду, 20% – до гідроген хлориду.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, стійкість, гідроген хлорид, жовч, натрій хлорид, фенол.

На сьогоднішній день з метою корекції балансу кишкової мікробіоти організму людини та тварин широко застосовують препарати, що отримали назву «пробіотики». Під даним терміном об'єднують біологічно активні добавки, що містять життєздатні бактерії та їх метаболіти, що проявляють антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [1].

У ветеринарній медицині пробіотичні препарати використовують для мікробної корекції кишківника після антибіотико- та хіміотерапії, для стимулювання неспецифічного імунітету, профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій тварин [2].

При селекції мікроорганізмів для створення пробіотичних препаратів основну увагу приділяють їх антагонічній активності. Однак на практиці далеко не всі пробіотичні препарати виявляють заявлений результат. Причини недостатньої ефективності пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу більшості препаратів, є їх слабка стійкість до впливу травних соків та жовчі, як наслідок, нестабільність прояву пробіотичної дії [3].

Тому створення нових ефективних пробіотиків на основі цілеспрямовано відібраних штамів пробіотичних мікроорганізмів, стійких до метаболітів травної системи організму-господаря є актуальним завданням.



Пробіотики, які сьогодні застосовуються для усунення проблем шлунково-кишкового тракту кролів є універсальними та рекомендуються для різних видів тварин, в тому числі і для кролів.

Проте, враховуючи особливості системи травлення кролів, будь-яке порушення в роботі якої може бути небезпечним не тільки для здоров'я, але і для їх життя в цілому, актуальним постає питання створення пробіотичного препарату на основі біологічно активних представників нормбіоценозу шлунково-кишкового тракту саме цих тварин. Перспективною групою мікроорганізмів для створення пробіотичного препарату для кролів є бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус «GRAS», тобто їх використання є абсолютно безпечним. Також варто зазначити, що чисельність молочнокислих бактерій в шлунково-кишковому тракті кролів перевищує чисельність біфідобактерій [4], а отже їх функціональна роль більш значуща.

Відомо, що молочнокислі бактерії, а особливо лактобацили, стійкі до кислотної реакції середовища [5]. Промислові штами бактерій роду *Lactobacillus*, які використовуються для виготовлення пробіотичних препаратів, як правило можуть розвиватися на середовищах при значеннях рН 4 та нижче [5, 6]. За даними Кігель Н. Ф., скринінг 85 промислових штамів показав, що лише 29 % від їх загальної кількості витримували певний час у живильному середовищі з рН 9,6, 31% – резистентні до 4,5% NaCl, 65% – до 40% медичної жовчі та 70% – до рН 3 та 0,3% фенолу [7]. Однак, постає питання чи поширюється дана закономірність на МКБ, виділених з кішківника кролів. З метою оцінки придатності використання досліджуваних штамів у промисловості важливим є визначення стійкості досліджуваних штамів до метаболітів травної системи.

Метою даної роботи було визначити вплив рН метаболітів травної системи на активність росту молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів.

Матеріали і методи

У роботі використано штами молочнокислих бактерій (МКБ): *L. lactis* 4/1, *L. casei* 5/4, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 16/3, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. delbrueckii* 39/2, виділені зі шлунково-кишкового тракту кролів, селекціоновані та ідентифіковані в лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН [8]. Для порівняння отриманих результатів, використовували бактерії виду *L. acidophilus*, тому що пробіотичні препарати найчастіше мають в своєму складі бактерії даного виду [6, 7]. Штам молочнокислих бактерій *L. acidophilus* ССМ 4833, отриманий з депозитарію Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ.

З метою визначення граничних значень рН для росту МКБ, досліджувани бактерії культивували на середовищі MRS [5] з 0,15% агару. Значення рН встановлювали 10% розчином оцтової кислоти (CH_3COOH) та 10% розчином натрій гідроксиду (NaOH). В пробірки, що містили 9 мл напіврідкого середовища MRS з заданим значенням рН середовища від 2 до 11 або концентрацією NaCl (1–6%), HCl (1–4%), жовчі (20, 40%) та фенолу (0,5%), вносили один мілілітр суспензії бактерій, що містила 1×10^6 КУО/мл та культивували



за температури $37 \pm 0,5$ °C упродовж 48 годин [5], у зв'язку з особливостями умов травлення кролів.

Кількість молочнокислих бактерій визначали методом граничних розведенень, висіваючи їх на щільне елективне середовище [5].

Загальну кількість бактерій розраховували за формулою:

$$X = Z \times 10^n / Y$$

Де X – кількість бактерій;

Z – кількість колоній, що виростили;

10^n – розведення;

Y – посівна доза.

Статистичне опрацювання результатів експериментів проводили використовуючи програму Microsoft Excel 2013.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати наших досліджень показали, що стійкість до низьких рН є штамовспецифічною ознакою. Встановлено, що всі досліджувані штами молочнокислих бактерій не росли на середовищі MRS після 48 годин культивування при значенні $\text{pH} \leq 3$ та $\text{pH} \geq 10$ (табл. 1). Вісім досліджуваних штамів витримували рН 4,0 середовища упродовж 48 годин. Чисельність мікроорганізмів через дві доби культивування була в межах від 10^3 до 10^9 КУО/мл. За результатами експерименту визначено оптимальне для росту всіх досліджуваних культур МКБ значення рН 5–7. Встановлено, що 70% штамів МКБ виділених з кишківника кролів, були стійкими до низьких значень рН середовища. Висока стійкість до низьких значень рН (4–6) досліджуваних штамів, на нашу думку, цілком закономірна, адже джерело їх виділення кишківник кролів. Оскільки, ферментативна активність травного соку шлунку кролів є більшою, ніж у інших травоядних тварин, у зв'язку з підвищеною кислотністю. Загальна кислотність шлункового соку кролика у 2–2,5 рази більша ніж у інших тварин, а вміст вільної соляної кислоти – від 0,11 до 0,27%, що відповідає рН 4 середовища. Варто зазначити, що корм, який споживають кролі, може проходити декілька циклів травлення та знаходиться в шлунково-кишковому тракті дуже довго, у зв'язку з слабкою здатністю до перистальтики кишківника даних тварин.

Оскільки, натрій хлорид – речовина, що бере участь в утворенні соляної кислоти шлункового соку і постійно міститься в макроорганізмі, бактерії, що входять до складу пробіотичних препаратів, повинні бути резистентними до даного чиннику.

На думку деяких дослідників та науковців, стійкість МКБ до осмотичного тиску зумовлена здатністю даних бактерій накопичувати бетаїн, який не метаболізується [6, 9]. Відомо, що промислові штами МКБ здатні рости в середовищі, що містить 1 М розчину натрій ацетату, калій хлориду або натрій хлориду, а деякі толерантні до 1,8 М NaCl.

Нами встановлено, що при внесенні до живильного середовища до 3% NaCl, ріст досліджуваних штамів суттєво не знижувався, титр становив 10^8 – 10^9 КУО/мл після 48 год культивування. Зі збільшенням концентрації солі до 4–5% менш стійкими виявилися штами: *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3,



L. delbrueckii 39/2, *L. acidophilus* 49/1 та штам *L. acidophilus* ССМ 4833. Решта штамів були резистентними та продовжували рости, титр бактерій становив 10^6 КУО/мл при концентрації 5% NaCl. Збільшення масової частки NaCl до 6% у живильному середовищі призвело до повного пригнічення росту мікроорганізмів. Стійкість МКБ, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, до NaCl наведена в таблиці 2, з якої видно, що 50% штамів виявилися стійкими.

Відомо, що HCl є серйозною перешкодою для проникнення мікроорганізмів до товстого відділу кишечника макроорганізму [6]. Однак, деякі МКБ, особливо ізольовані з більш кислих середовищ, успішно долають несприятливі умови і заселяються в товстому відділі кишечника. Як зазначалося вище у здорових кролів шлунок має вищу кислотність, порівняно з людиною та іншими тваринами, а тому даний показник є вагомим при створенні пробіотичного препарату для цих тварин.

З'ясовано, що після 48 годин інкубації на середовищі MRS з 1% HCl найбільш стійкими виявилися досліджувані штами *L. lactis* 4/1 та *L. helveticus* 13/2, титр цих культур становив 10^8 КУО /мл. Решта штамів були менш резистентними до гідроген хлориду (табл. 2). При культивуванні досліджуваних штамів МКБ на середовищі, що містило 3% HCl, чисельність бактерій значно знижувалася і становила 10^3 – 10^5 КУО/мл після 48 год культивування, лише 20% штамів, виділених з кишечника кролів, були відносно стійкими.

Встановлено, що шість штамів, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів, проявили толерантність до HCl більшою мірою, порівняно з типовим штамом молочнокислих бактерій *L. acidophilus* ССМ 4833. Варто зазначити, що повне пригнічення досліджуваних бактерій спостерігалось при внесенні в живильне середовище 4% соляної кислоти.

Стійкість до жовчі травної системи є необхідною умовою для колонізації та метаболічної активності бактерій у кишечнику господаря, оскільки відомо, що клітинні мембрани мікроорганізмів є дуже чутливими до жовчних кислот [10]. Ця ознака забезпечує досягнення МКБ тонкого та товстого відділу кишечника та підтримку нормобалансу його мікробіоти. Як відомо, МКБ впливають на засвоєння холестерину макроорганізмом, за рахунок жовчно-солевого обміну цих бактерій [11]. Механізми, за допомогою яких пробіотичні бактерії здатні витримати стрес, спричинений жовчними солями залишаються нез'ясованими, однак на думку деяких дослідників стійкість ґрунтується на гідролізі жовчних солей [12]. Як правило, вона зумовлена трьома основними механізмами: а) секвеструванням солей і жовчних кислот; б) декон'югацією жовчних кислот; в) біотрансформацією (тобто епімеризацією, дегідруванням і дегідроксилуванням) солей жовчних кислот.

За рахунок цих механізмів, штами бактерій роду *Lactobacillus*, які використовуються в промисловості є стійкими до високих концентрацій жовчі та ростуть при значних її концентраціях (інколи > 40%) [12].

В зв'язку з цим, наступним етапом наших досліджень було встановлення стійкості штамів МКБ до жовчі. Після 48 годин інкубації шести досліджуваних штамів: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. acidophilus* 49/1, *L. acidophilus* ССМ 4833 на середовищі MRS з 20% жовчі, було виявлено, що їх титри суттєво не відрізнялися, порівняно з контрольними.



Таблиця 1

Вплив рН середовища на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Table 1

Effect of pH media on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml (M±m, n=3)

Штам	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833	$(3,2 \pm 0,24) \times 10^3$	$(6,25 \pm 0,56) \times 10^8$	$(4,4 \pm 0,65) \times 10^9$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^8$	$(4,7 \pm 0,43) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,45) \times 10^3$
<i>L. lactis</i> 4/1	-	$(2,25 \pm 0,41) \times 10^7$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,35) \times 10^8$	$(4,4 \pm 0,65) \times 10^6$	$(3,2 \pm 0,24) \times 10^4$
<i>L. casei</i> 5/4	-	$(1,4 \pm 0,16) \times 10^8$	$(4,4 \pm 0,65) \times 10^9$	$(6,25 \pm 0,56) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^5$	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^3$
<i>L. helveticus</i> 13/2	$(2,4 \pm 0,31) \times 10^3$	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$	$(4,4 \pm 0,23) \times 10^9$	$(2,8 \pm 0,25) \times 10^7$	$(2,6 \pm 0,12) \times 10^5$	$(6,25 \pm 0,56) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 16/1	-	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^9$	$(2,5 \pm 0,32) \times 10^8$	$(4,8 \pm 0,74) \times 10^6$	$(2,95 \pm 0,26) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 16/3	$(4,4 \pm 0,35) \times 10^3$	$(2,05 \pm 0,08) \times 10^8$	$(2,0 \pm 0,35) \times 10^9$	$(3,36 \pm 0,20) \times 10^8$	$(2,25 \pm 0,41) \times 10^5$	$(5,4 \pm 0,43) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 17/2	$(2,25 \pm 0,41) \times 10^3$	$(2,5 \pm 0,30) \times 10^8$	$(1,8 \pm 0,27) \times 10^9$	$(2,6 \pm 0,12) \times 10^8$	$(3,2 \pm 0,24) \times 10^6$	$(3,30 \pm 0,34) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 17/3	$(3,45 \pm 0,31) \times 10^3$	$(6,5 \pm 0,58) \times 10^7$	$(8,4 \pm 0,67) \times 10^9$	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$	$(6,25 \pm 0,56) \times 10^5$	$(3,15 \pm 0,27) \times 10^3$
<i>L. acidophilus</i> 31/2	$(5,8 \pm 0,55) \times 10^3$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^7$	$(9,4 \pm 0,85) \times 10^9$	$(5,4 \pm 0,39) \times 10^8$	$(4,05 \pm 0,38) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,45) \times 10^3$
<i>L. delbrueckii</i> 39/2	$(4,8 \pm 0,74) \times 10^3$	$(4,7 \pm 0,43) \times 10^6$	$(2,95 \pm 0,28) \times 10^8$	$(1,9 \pm 0,36) \times 10^7$	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^4$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^3$
<i>L. acidophilus</i> 49/1	$(2,5 \pm 0,32) \times 10^3$	$(3,36 \pm 0,20) \times 10^6$	$(2,25 \pm 0,41) \times 10^8$	$(5,4 \pm 0,27) \times 10^7$	$(2,4 \pm 0,31) \times 10^4$	$(4,4 \pm 0,65) \times 10^3$

Примітка: у цій таблиці «-» – відсутність життєздатних клітин.

Note: in this table «-» – lack of viable cells.

Таблиця 2

Вплив NaCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Table 2

Effect of NaCl on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml (M±m, n=3)

Штами	Контроль (без NaCl)	Масова частка NaCl				
		1%	2%	3%	4%	5%
<i>L. acidophilus</i> ССМ 4833	$(6,9 \pm 0,21) \times 10^9$	$(5,8 \pm 0,21) \times 10^9$	$(2,25 \pm 0,36) \times 10^9$	$(1,35 \pm 0,24) \times 10^8$	$(4,15 \pm 0,36) \times 10^6$	$(2,2 \pm 0,31) \times 10^4$
<i>L. lactis</i> 4/1	$(8,2 \pm 0,88) \times 10^9$	$(3 \pm 1,1) \times 10^9$	$(0,94 \pm 0,043) \times 10^{9***}$	$(4,85 \pm 0,33) \times 10^8$	$(9,79 \pm 0,51) \times 10^7$	$(1,75 \pm 0,36) \times 10^{6**}$
<i>L. casei</i> 5/4	$(9,2 \pm 0,52) \times 10^8$	$(1,3 \pm 0,14) \times 10^{9*}$	$(2,7 \pm 0,127) \times 10^{9***}$	$(9,2 \pm 0,52) \times 10^{8***}$	$(1,9 \pm 0,36) \times 10^{7**}$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^6$
<i>L. helveticus</i> 13/2	$(7,4 \pm 0,35) \times 10^9$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^{9*}$	$(8,4 \pm 0,23) \times 10^{9*}$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^9$	$(4,35 \pm 0,40) \times 10^{8**}$	$(3,2 \pm 0,24) \times 10^{6**}$
<i>L. plantarum</i> 16/1	$(8,95 \pm 0,41) \times 10^9$	$(8,1 \pm 0,20) \times 10^{9*}$	$(6,18 \pm 1,88) \times 10^9$	$(4,8 \pm 0,74) \times 10^{8**}$	$(2,45 \pm 1,3) \times 10^7$	$(2,5 \pm 0,32) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> 16/3	$(7,35 \pm 0,41) \times 10^9$	$(3,5 \pm 0,17) \times 10^{9***}$	$(3,15 \pm 0,27) \times 10^{9***}$	$(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$	$(4,7 \pm 0,43) \times 10^7$	$(2,25 \pm 0,41) \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> 17/2	$(8,75 \pm 0,61) \times 10^9$	$(3,36 \pm 0,20) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,35) \times 10^9$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^{8**}$	$(2,35 \pm 0,22) \times 10^{6**}$	$(7,3 \pm 0,52) \times 10^{4**}$
<i>L. plantarum</i> 17/3	$(9,05 \pm 0,31) \times 10^9$	$(8,3 \pm 0,27) \times 10^{9***}$	$(4,7 \pm 0,43) \times 10^9$	$(1,35 \pm 0,24) \times 10^8$	$(5,1 \pm 0,46) \times 10^{6***}$	$(4,70 \pm 0,42) \times 10^{4***}$
<i>L. acidophilus</i> 31/2	$(8,35 \pm 0,2) \times 10^9$	$(6,9 \pm 0,2) \times 10^{9**}$	$(2,35 \pm 0,22) \times 10^{9**}$	$(4,05 \pm 0,38) \times 10^{9**}$	$(4,70 \pm 0,42) \times 10^{8***}$	$(3,8 \pm 1,2) \times 10^6$
<i>L. delbrueckii</i> 39/2	$(8,0 \pm 0,17) \times 10^9$	$(2,6 \pm 0,12) \times 10^{9*}$	$(4,95 \pm 0,41) \times 10^{9**}$	$(3,30 \pm 0,34) \times 10^{8**}$	$(3 \pm 1,1) \times 10^6$	$(4,4 \pm 0,65) \times 10^{4**}$
<i>L. acidophilus</i> 49/1	$(6,75 \pm 0,31) \times 10^9$	$(4,1 \pm 0,17) \times 10^{9***}$	$(4,8 \pm 0,45) \times 10^{9***}$	$(8,35 \pm 0,68) \times 10^{8***}$	$(6,25 \pm 0,56) \times 10^{7*}$	$(4,8 \pm 0,74) \times 10^4$

Примітка: у цій таблиці * – $p < 0,05$ – $0,02$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.Note: in this table * – $p < 0,05$ – $0,02$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Таблиця 3

Вплив HCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл ($M \pm m$, $n=3$)

Table 3

Effect of HCl on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml ($M \pm m$, $n=3$)

Штам	Контроль (без HCl)	Масова частка HCl		
		1%	2%	3%
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833	$(6,90 \pm 0,21) \times 10^9$	$(3,90 \pm 0,45) \times 10^7^*$	$(6,20 \pm 0,88) \times 10^5$	$(2,85 \pm 0,29) \times 10^4$
<i>L. lactis</i> 4/1	$(8,20 \pm 0,88) \times 10^9$	$(2,30 \pm 0,30) \times 10^8$	$(3,20 \pm 0,32) \times 10^6$	$(3,00 \pm 0,30) \times 10^{5*}$
<i>L. casei</i> 5/4	$(9,20 \pm 0,52) \times 10^8$	$(3,04 \pm 0,42) \times 10^7$	$(1,70 \pm 0,35) \times 10^{6**}$	$(5,30 \pm 0,46) \times 10^{3*}$
<i>L. helveticus</i> 13/2	$(7,40 \pm 0,35) \times 10^9$	$(2,40 \pm 0,31) \times 10^8$	$(2,95 \pm 0,41) \times 10^6$	$(4,05 \pm 0,38) \times 10^{5**}$
<i>L. plantarum</i> 16/1	$(8,95 \pm 0,41) \times 10^9$	$(2,95 \pm 0,26) \times 10^7^*$	$(3,15 \pm 2,41) \times 10^9$	$(2,70 \pm 0,27) \times 10^4$
<i>L. plantarum</i> 16/3	$(7,35 \pm 0,41) \times 10^9$	$(3,20 \pm 0,24) \times 10^{6*}$	$(1,75 \pm 0,21) \times 10^{6**}$	$(3,00 \pm 1,33) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 17/2	$(8,75 \pm 0,61) \times 10^9$	$(7,30 \pm 0,52) \times 10^{6*}$	$(4,15 \pm 0,41) \times 10^{6*}$	$(2,70 \pm 0,27) \times 10^3$
<i>L. plantarum</i> 17/3	$(9,05 \pm 0,31) \times 10^9$	$(2,40 \pm 0,38) \times 10^6$	$(1,25 \pm 0,27) \times 10^{5*}$	$(2,70 \pm 0,27) \times 10^3$
<i>L. acidophilus</i> 31/2	$(8,35 \pm 0,20) \times 10^9$	$(5,30 \pm 0,39) \times 10^7$	$(4,15 \pm 0,67) \times 10^{6*}$	$(8,40 \pm 0,23) \times 10^{4**}$
<i>L. delbrueckii</i> 39/2	$(8,00 \pm 0,17) \times 10^9$	$(4,85 \pm 0,33) \times 10^{7**}$	$(2,85 \pm 0,67) \times 10^{6*}$	$(1,35 \pm 0,24) \times 10^{4*}$
<i>L. acidophilus</i> 49/1	$(6,75 \pm 0,31) \times 10^9$	$(2,35 \pm 0,22) \times 10^{7**}$	$(3,90 \pm 1,21) \times 10^6$	$(8,40 \pm 0,23) \times 10^4$

Примітка: у цій таблиці * – $p < 0,05-0,02$; ** – $p < 0,01$.Note: in this table * – $p < 0,05-0,02$; ** – $p < 0,01$.

Відносно менш стійкими до 20% жовчі були штами: *L. casei* 5/4, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. delbrueckii* 39/2, титр бактерій яких становив 10^8 КУО/мл. Однакову толерантність до вищої концентрації жовчі (40%) спостерігали у всіх досліджених штамів. Життєздатність через 48 годин після культивування складала 10^8 КУО/мл (табл. 4).

Такі показники стійкості досліджуваних пробіотичних бактерій до наявності жовчі у живильному середовищі, на нашу думку, зумовлені джерелом їх виділення. Відомо, що МКБ належать до представників облигатної мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини та тварин, в тому числі і кролів. У зв'язку з цим, наявність даного метаболіту травної системи в середовищі існування для досліджуваних бактерій є природним.

Важливим є визначення толерантності МКБ до фенолу (0,5%), оскільки лише стійкі форми пробіотичних мікроорганізмів здатні приживатися у шлунково-кишковому тракті макроорганізму. Усі досліджувані штами молочнокислих бактерій проявляли стійкість до фенолу. Життєздатність через 48 годин після культивування на середовищі, що містило 0,5% фенолу складала 10^8 КУО/мл (табл. 4).



Таблиця 4
Вплив жовчі та фенолу на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл ($M \pm m$, $n=3$)
Table 4
Effect of bile and phenol on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml ($M \pm m$, $n=3$)

Штам	Контроль (без жовчі та фенолу)	Масова частка фенолу 0,5%	Масова частка жовчі	
			20%	40%
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833	$(6,9 \pm 0,21) \times 10^9$	$(3,05 \pm 0,28) \times 10^8$	$(1,8 \pm 0,28) \times 10^9$	$(3,45 \pm 0,24) \times 10^8$
<i>L. lactis</i> 4/1	$(8,2 \pm 0,88) \times 10^9$	$(3,36 \pm 0,20) \times 10^8$	$(4,35 \pm 0,40) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,35) \times 10^{8*}$
<i>L. casei</i> 5/4	$(9,2 \pm 0,52) \times 10^8$	$(3 \pm 1,1) \times 10^8$	$(5,3 \pm 0,39) \times 10^{8*}$	$(1,30 \pm 0,14) \times 10^{8*}$
<i>L. helveticus</i> 13/2	$(7,4 \pm 0,35) \times 10^9$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^{8*}$	$(9,79 \pm 0,51) \times 10^9$	$(1,35 \pm 0,24) \times 10^{8*}$
<i>L. plantarum</i> 16/1	$(8,95 \pm 0,41) \times 10^9$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^{8*}$	$(9,2 \pm 0,52) \times 10^{8**}$	$(1,9 \pm 0,36) \times 10^{8*}$
<i>L. plantarum</i> 16/3	$(7,35 \pm 0,41) \times 10^9$	$(4,8 \pm 0,45) \times 10^8$	$(7,4 \pm 0,23) \times 10^{9**}$	$(2,5 \pm 0,32) \times 10^{8*}$
<i>L. plantarum</i> 17/2	$(8,75 \pm 0,61) \times 10^9$	$(1,9 \pm 0,36) \times 10^8$	$(6,18 \pm 1,88) \times 10^8$	$(2,0 \pm 0,35) \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> 17/3	$(9,05 \pm 0,31) \times 10^9$	$(3,15 \pm 0,27) \times 10^8$	$(1,2 \pm 0,25) \times 10^{8*}$	$(4,8 \pm 0,74) \times 10^8$
<i>L. acidophilus</i> 31/2	$(8,35 \pm 0,2) \times 10^9$	$(2,35 \pm 0,22) \times 10^8$	$(3 \pm 1,1) \times 10^9$	$(4,1 \pm 0,17) \times 10^8$
<i>L. delbrueckii</i> 39/2	$(8,0 \pm 0,17) \times 10^9$	$(1,35 \pm 0,24) \times 10^8$	$(2,2 \pm 0,29) \times 10^{8*}$	$(3,45 \pm 0,24) \times 10^8$
<i>L. acidophilus</i> 49/1	$(6,75 \pm 0,31) \times 10^9$	$(4,70 \pm 0,42) \times 10^8$	$(7,3 \pm 0,62) \times 10^9$	$(6,9 \pm 0,2) \times 10^{8**}$

Примітка: у цій таблиці * – $p < 0,05-0,02$; ** – $p < 0,01$.
Note: in this table * – $p < 0,05-0,02$; ** – $p < 0,01$.

Таким чином, встановлено, що усі досліджувані штами МКБ стійкі до високих концентрацій жовчі та фенолу, 70% – до низьких значень рН, 50% – натрій хлориду, 20% – гідроген хлориду. Ця властивість дозволить даним бактеріям витримати несприятливі умови шлунково-кишкового тракту та потрапити у товстий відділ кишківника макроорганізму при пероральному введенні.

З отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані штами: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2 є перспективними для створення пробіотичних препаратів, оскільки вони виявилися найбільш стійкими до метаболітів травної системи.



Ю.Н. Похилько, Н.А. Кравченко

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного
производства НААН, ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина,
тел. : +38 (046) 223 17 49, e-mail: pohilko.yura@gmail.com

УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* К МЕТАБОЛИТАМ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Реферат

Цель. Целью данной работы было определить влияние pH метаболитов пищеварительной системы на активность роста молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта кроликов. **Методы.** В работе использовано 11 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта кроликов. Устойчивость бактерий к метаболитам пищеварительной системы определяли путем их культивирования в среде MRS с желчью, водород хлорида, натрия хлорида, фенолом. **Результаты.** Установлено, что исследуемые штаммы выживали при pH среды 4,0–9,0. Все штаммы имели высокую устойчивость к концентрации желчи (20, 40%), хлорида водорода (3%), хлорида натрия (5%), фенола (0,5%), количество жизнеспособных клеток – 103–105 КОЕ / мл после 48 часов культивирования. **Выводы.** Установлено, что исследуемые штаммы лактобацилл были устойчивыми к высоким концентрациям желчи и фенола, 70% – к низким значениям pH, 50% – к хлориду натрия, 20% – к водороду хлорида. **Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, устойчивость, водорода хлорид, желчь, натрия хлорид, фенол.

Yu.M. Pohilko, N.O. Kravchenko

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture NAAS, 97,
Shevchenko str., Chernigiv, 14027, tel. : +38 (046) 223 17 49,
e-mail: pohilko.yura@gmail.com

RESISTANCE OF BACTERIA OF THE GENUS *LACTOBACILLUS* TO THE METABOLITES OF THE DIGESTIVE SYSTEM

Summary

Aim. The purpose of this study was to determine the effect of the pH of metabolites in the digestive system on the growth activity of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits. **Methods.** The paper used 11 strains of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits. Stability of bacteria to the metabolites of the digestive system was determined by culturing them in MRS medium with bile, hydrogen chloride, sodium chloride, phenol. **Results.** It was found that the strains studied survived at a pH of 4.0 to 9.0. All the strains had high resistance to bile concentration (20, 40%), hydrogen chloride (3%), sodium chloride (5%), phenol (0.5%), viable cells - 103–105 CFU / ml after 48 hours cultivation. **Conclusions.** It was found that the studied strains of lactobacilli were resistant to high concentrations of bile and phenol, 70% to low pH, 50% to sodium chloride, and 20% to hydrogen chloride. **Key words:** lactic acid bacteria, resistance, hydrogen chloride, bile, sodium chloride, phenol.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гамко Л.Н., Сидоров И.И., Талызина Т.Л., Черненко Ю.Н. Пробиотики на смену антибиотикам. – Брянск: Издательство Брянского ГАУ, 2015. – 136 с.
2. Моркляк М.І., Брижчук А.А. Фармакологічні аспекти використання пробіотиків // Ветеринарна медицина України – 2015. – № 6. – С. 42–42.
3. Даниленко С.Г. Дослідження впливу різних факторів на життєздатність молочнокислих бактерій // Продовольчі ресурси. Серія: Технічні науки – 2014. – № 3. – С. 130–134.
4. Похилько Ю.М., Кравченко Н.О. Состав микробиоценозу шлунково-кишечного тракту молодняку кролів залежно від раціону // Науково-технічний бюлетень – 2016. – 17, № 1. – С. 141–146.
5. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования – М.: Наука, 1975. – 384 с.
6. Enrica P. Interactive probiotics // Department of Life Sciences and Systems Biology University of Torino – Italy: CRC Press, 2014. – P. 274.
7. Кігель Н.Ф., Насирова Г.Ф. Критерії відбору заквашувальних культур // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 2. – С. 58–60.
8. Ю.Н. Похилько, Н.О. Кравченко. Виділення із травної системи кролів молочнокислих бактерій, перспективних для створення пробіотичних препаратів // Біоресурси і природокористування. – 2016. – 8, №5–6. – С. 63–66.
9. Li Chun, et al. NaCl stress impact on the key enzymes in glycolysis from *Lactobacillus bulgaricus* during freeze-drying. // Brazilian Journal of Microbiology – 2015. – № 46.4. – P. 1193–1199.
10. Ridlon J. M., Harris S. C., Bhowmik S. Kang, D. J., Hylemon, P. B. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria // Gut microbes – 2016. – 7 № 1. – С. 22–39.
11. Ruiz L., Margolles A., Sánchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Frontiers in Microbiology – 2013. – № 4(396). – P. 1–8.
12. Safitri, Ratu, et al. The Tolerance of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus curvatus* Originated From Bovine Colostrum Towards Acidity and Bile Salts as Probiotics Candidate // Advance Journal of Food Science and Technology – 2016. – 11(1) – P. 60–63.

References

1. Gamko LN, Sidorov II, Talyzina TL, Chernenok N. Probiotics replace antibiotics. Bryansk State University of Agriculture Publisher, Bryansk, 2015. 136 p.
2. Morklyak MI, Bryzhchuk AA. Pharmacological aspects of probiotics. Veterinarna medicina Ukraini. 2015; (6): 42-42.
3. Danilenko SG. The influence of various factors on the viability of lactic acid bacteria. Prodovol'chi resursi. Seriya: Tekhnichni nauki. 2014; (3): 130-134.
4. Pokhilko YuM, Kravchenko NO. Composition of microbiota of the gastrointestinal tract of rabbits depending on ration. Naukova - tehnicny bulletin. 2016; 17 (1): 141 - 146.
5. Kvasnikov EI. Lactic acid bacteria and the way of their use. Nauka, Moscow, 1975. 384 p.



6. Enrica P. Interactive probiotics // Department of Life Sciences and Systems Biology University of Torino – Italy: CRC Press, 2014. – P. 274.
7. Kigel' NF, Nasirova GF. Criteria for the selection of starter cultures // *Visnik agrarnoyi nauki*. 2002; № 2: 58-60.
8. Pokhilko YuM, Kravchenko NO. Isolation from the digestive system of rabbits lactic acid bacteria, promising for the development probiotic preparations // *Bioresursi i prirodokoristuvannya*. 2016; 8, №5–6: 63–66.
9. Li Chun, et al. NaCl stress impact on the key enzymes in glycolysis from *Lactobacillus bulgaricus* during freeze-drying. *Brazilian journal of microbiology*. 2015; 46.4: 1193-1199.
10. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut microbes*. 2016; 7(1): 22-39.
11. Ruiz L, Margolles A and S6nchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in microbiology*. 2013;4(396): 1-8.
12. Safitri R et al. The Tolerance of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus curvatus* originated from bovine colostrum towards acidity and bile salts as probiotics candidate. *Advance journal of food science and technology*. 2016, 11(1): 60-63.

Стаття надійшла до редакції 01.12.2016 р.

