

УДК 576.8.095.38

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко, І.Г. Успенський

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Ак. Заболотного, 154, Київ, Д 03143, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

СКРИНІНГ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ПРОБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

*Досліджено пробіотичні властивості штамів біфідобактерій, ізольованих від людей різних вікових груп. Відібрані штами *B. animalis* subsp. *lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium* sp. 271 та *B. bifidum* 278 як перспективні для створення пробіотиків для дітей, а штами *Lactobacillus* sp. 25А, *Bifidobacterium* sp.82Д та *B. bifidum* 34s – для людей середнього та похилого віку. Дані штами є антагоністами широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів, активно адгезують до клітин макроорганізму, відрізняються високою швидкістю росту і активністю кислотоутворення. Штами, ізольовані від дорослих людей, є толерантними до присутності фізіологічної концентрації жовчі у середовищі та низьких значень рН (штам *Lactobacillus* sp. 25А).*

Ключові слова: біфідобактерії, молочнокислі бактерії, адгезія, чутливість до антибіотиків, скринінг, пробіотики.

Одним з досягнень кінця ХХ ст. є розробка і впровадження у життя концепції «пробіотики і функціональне харчування». Практика застосування біопрепаратів та біопродуктів показала в цілому позитивний вплив на відновлення кишкового мікробіоценозу та підвищення загальної резистентності макроорганізму.

Хоча для виготовлення пробіотиків і продуктів харчування використовуються представники різних видів, і навіть родів, найбільш популярними в наш час є препарати та біопродукти на основі біфідобактерій [1]. Згідно вимогам Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), пробіотиками називаються лише ті препарати, що відповідають критеріям відбору штамів. Зокрема, вони повинні проявляти високу антагоністичну активність проти патогенних мікроорганізмів (в тому числі, продукувати специфічні антимікробні речовини) та мати здатність до адгезії на клітинах епітелію макроорганізму, мати природ-



ну стійкість до широкого спектру антибіотиків [2]. Крім того, пробіотичні культури повинні зберігати життєздатність при проходженні через шлунково-кишковий тракт та при зберіганні. На жаль, за даними літератури, штами біфідобактерій, що широко використовуються у наш час у складі біопрепаратів та біопродуктів часто не відповідають вищезазначеним вимогам. Тому, актуальною і перспективною є направлена селекція штамів біфідобактерій за заданими властивостями для створення більш ефективних пробіотичних препаратів і функціональних продуктів нового покоління.

Метою даної роботи був скринінг та вивчення пробіотичних властивостей штамів молочнокислих бактерій та біфідобактерій, ізольованих від людини, для подальшого створення на їх основі пробіотичних препаратів і біопродуктів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були біфідобактерії та молочнокислі бактерії, ізольовані з кишкового тракту людей різних вікових груп: здорові та хворі на пневмонію діти (віком 2—3 роки), люди середнього віку (25—30 років) та люди похилого віку (63—81 років). Серед 129 виділених штамів був попередньо проведений скринінг за ознакою антагоністичної активності проти широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів (дані не наведені). У результаті скринінгу було відібрано 29 штамів біфідобактерій та 4 штами молочнокислих бактерій — найбільш активних антагоністів, які були включені у подальші дослідження. Штами були ідентифіковані на рівні роду із застосуванням загальноприйнятих мікробіологічних методів, а також методу ПЛР з використанням родоспецифічних праймерів. На видовому рівні штами були ідентифіковані за допомоги мультиплекс-ПЛР-аналізу з видоспецифічними праймерами [3]. Список штамів наведений у таблиці 1.

Стійкість до дії шлункового соку вивчали за методом *Matto* зі співавт. [4]. Штами біфідобактерій вирощували протягом 48 год в анаеробних умовах при 37 °С в рідкому середовищі MRS з 0,05% цистеїну (MRSC). Бактеріальні клітини центрифугували, відмивали та ресуспендували у PBS буфері (рН 7,2). Порцію суспензії клітин у кількості 0,2 мл змішували з 0,2 мл PBS буфера рН 3,0 (дослідна суспензія) та з 0,2 мл PBS буфера рН 7,2 (контроль). Суспензію клітин інкубували при 37 °С на водяній бані і робили серійні розведення до 10⁻⁷. З кожного розведення переносили по 10 мкл на MRSC агар: з дослідної суспензії — після 2 год інкубації, з контролю — безпосередньо перед інкубацією та після 2 годин інкубації. Посіви інкубували протягом 48 год в анаеробних умовах при 37 °С. Отримані результати виражали як різницю десятинних логарифмів між контрольними та дослідними показниками.

Здатність рости у присутності жовчі вивчали, використовуючи MRSC агар, до якого додавали жовч у кількості 0,1, 0,2 та 0,3% [5]. Кожен штам вирощували при 37 °С протягом 48 год. Фіксували наявність росту на поверхні агару.



Таблиця 1
Штами біфідобактерій та молочнокислих бактерій, використані в роботі

Table 1

Strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria used in the study

Джерело виділення	Штам	Вид
Здорові діти	99	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
	102, 152, 174, 175	<i>B. bifidum</i>
	139, 142, 143, 144, 145	<i>B. longum</i>
	460	<i>B. catenulatum</i>
Хворі діти	271	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	272, 278	<i>B. bifidum</i>
	276	<i>B. longum</i>
Люди середнього віку	25a	<i>Lactobacillus</i> sp.*
	62a, 75a, 76a	<i>Lactobacillus</i> sp. *
Люди похилого віку	81д, 82д	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	34s, 35s, 77s	<i>B. bifidum</i>
	50s, 52s	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	47s, 51s, 53s, 55s, 66/2s, 66/3s, 69s	<i>B. dentium</i>

* — не ідентифіковані до виду

З метою первинного скринінгу високоадгезивних штамів біфідобактерій було використано метод Choo зі співавт. на моделі «букальний епітеліоцит — бактерія» [6]. У дослідних центрифужних пробірках поєднували по 0,5 мл попередньо підготовлені суспензії ентероцитів і біфідобактерій, у відповідних концентраціях 10^6 та 10^9 клітин, та інкубували при 37°C протягом 30 хв, періодично струшуючи. Потім готували мазки, забарвлювали за Грамом і мікроскопували при збільшенні $\times 1500$. Про ступінь адгезивності штаму судили по індексу адгезивності мікроорганізму (ІАМ) — середня кількість мікробних клітин на одному епітеліоциті з урахуванням 50 епітеліоцитів, що беруть участь у адгезивному процесі.

Гідрофобність клітин біфідобактерій досліджували за методом Р.Ф. Perez зі співавт. [7]. Як «допоміжну» субстанцію використовували ксилол. Добову культуру біфідобактерій ретельно перемішували, відбирали 2 мл і вимірювали її оптичну густину при довжині хвилі 620 нм. До бактеріальної суспензії додавали 0,4 мл ксилолу і інтенсивно перемішували протягом 2 хв, після чого витримували при 37°C протягом 1 год для розділу фаз ксилол:зразок. Потім водяну (нижню) фазу ретельно



відбирали і вимірювали її оптичну густина при довжині хвилі 600 нм. Значення гідрофобності виражали як:

$$\frac{\text{оптична густина водної фази}}{\text{оптична густина всієї суспензії до екстрагування ксилолом}} \times 100\%$$

Дослідження антибіотикочутливості. В роботі використовували різні за механізмом біологічної дії класи антибіотиків, а саме (ОД): бензилпеніцилін (10); оксацилін (1); карбеніцилін (100); піперацилін (100); цефалексин (30); цефотаксим (30); цефепим (30); іміпенем (10); ванкомицин (10); нетілміцин (30); лінкомицин (15); кліндаміцин (2); тетрациклін (30); фузидин (10); нітрофурантоїн (300); еритроміцин (15); рокситроміцин (30); хлорамфенікол (30); норфлуксацин (10); офлуксацин (5); рифампіцин (5); клотримазол (10); флуконазол (40).

Визначення антибіотикочутливості біфідобактерій проводили за диско-дифузійним методом, описаним Charteris зі співавт. [8]. Отримані результати виражали як: Ч – чутливі, СЧ – середньо чутливі, Р – резистентні.

Для дослідження гемолітичної активності штами біфідобактерій вирощували на Колумбія-агарі з 5% овечої крові при 37 °С протягом 4 діб, після чого чашки витримували на повітрі протягом 5 год. Наявність реакції гемолізу визначали візуально.

З метою первинного скринінгу штамів з високою швидкістю росту штами біфідобактерій вирощували в рідкому середовищі MRS з цистеїном в анаеробних умовах при 37 °С і вимірювали оптичну густина суспензії клітин при довжині хвилі 620 нм через 24 год вирощування. Ріст вважали активним, якщо оптична густина суспензії OD_{620} сягала 4 одиниць за стандартом Макфарланда (що відповідає $1,2 \times 10^9$ КУО/мл).

Активність кислотоутворення біфідобактерій визначали титрометричним методом після вирощування мікроорганізмів у печінковому середовищі Блаурока. Активність кислотоутворення виражали в градусах Тернера (°Т) .

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету комп'ютерної програми «Excel XP» за загальноприйнятими методиками, рівень вірогідності складав 95% [3].

Результати та обговорення

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 [5]. Саме хлоридна кислота та травні ферменти є головними агресивними агентами шлункового вмісту щодо мікроорганізмів. Результати досліджень представлені у таблиці 2. Як видно, практично всі досліджувані штами є чутливими



до дії низьких значень рН. Лише клітини одного штаму – *Lactobacillus* sp. 25А витримували двогодинну експозицію в умовах шлунку. Отримані результати підтверджують дані, описані іншими авторами, які свідчать про високу чутливість біфідобактерій до кислого середовища, та толерантність до нього багатьох представників роду *Lactobacillus* [4].

Дослідження штамів щодо росту в присутності різних концентрацій жовчі (табл. 3) показало залежність даної властивості від джерела виділення штаму. Більш чутливими до присутності жовчі виявилися штами, отримані від дітей. Так, лише десять з п'ятнадцяти штамів росли при концентрації жовчі 0,1%. За вищих концентрацій жовчі у середовищі росту даних штамів не спостерігалось. Штами, виділені від людей середнього віку та літніх людей, були стійкими до присутності у середовищі 0,1% жовчі, майже всі штами – до 0,2% (окрім *B. dentium* 55s). У присутності 0,3% жовчі був здатний активно рости лише штам *B. bifidum* 77s, ще у 9 штамів спостерігався слабкий ріст.

Залежність здатності досліджуваних штамів рости в присутності жовчі від джерела їх виділення та від віку людини, очевидно, пов'язано з фізіологією кишкового тракту людини у різному віці. Так, за даними інших авторів, у дітей концентрація жовчі в тонкому кишечнику коливається від 0,1 до 0,3%, тоді як у дорослої людини вона складає 0,3% і вище [1,4,5]. Висловлено думку, що штами, ізольовані від дорослих людей, піддавалися в кишковому тракті дії високих концентрацій жовчі і тому є більш стійкими до неї.

Як зазначалося вище, наявність адгезивних властивостей у пробіотичних культур є критерієм їх ефективності при використанні в біопрепаратах. У результаті проведених досліджень виявилось, що всі штами здатні адгезувати до букального епітелію людини, причому індекс адгезивності варіював в широкому діапазоні – від $1,76 \pm 0,09$ до $48,1 \pm 0,08$. Адгезивна активність не залежала ні від виду мікроорганізму, ні від джерела виділення і мала штамову специфічність, що підтверджують дані інших авторів [6,7]. Найактивніше до букального епітелію адгезували штами *B. animalis* subsp. *lactis* 99 (IAM $48,1 \pm 0,08$), *B. longum* 144 (IAM $34,7 \pm 0,02$), *B. bifidum* 278 (IAM $28,7 \pm 0,14$), *B. bifidum* 34s (IAM $27,31 \pm 0,01$) та *B. catenulatum* 460 (IAM $27,31 \pm 0,01$). Слабку адгезивну активність проявили штами 62А (IAM $3,30 \pm 0,17$), *B. longum* 145 (IAM $2,93 \pm 0,17$) та *B. longum* 143 (IAM $1,76 \pm 0,09$).

Звертає на себе увагу той факт, що штами 47s, 51s, 53s, 55s та 69s, які відносяться до виду *B. dentium* – представника мікробіоти ротової порожнини, що викликає карієс зубів, не проявили високої адгезивної активності до букального епітелію (IAM від $4,60 \pm 0,02$ до $15,21 \pm 0,01$).

За даними літератури, гідрофобність поверхні клітин мікроорганізмів обумовлює (хоча і частково) їх адгезивну активність. Крім того, спостерігається кореляція між ступенем гідрофобності клітинни і здатності мікроорганізмів прикріплюватися до клітин макроорганізму [7].



Таблиця 2

Пробіотичні властивості досліджуваних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій

Table 2

Probiotic properties of the studied strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria

Штам	Ріст в присутності жовчі**			OD ₆₂₀	Кислотоутворення, °Т	Адгезія (ІАМ)	Гідрофобність клітин, %
	0,1%	0,2%	0,3%				
<i>B. animalis subsp. lactis</i> 99	—	—	—	4,1±0,2	218,3±6,9	48,10±0,08	5
<i>B. bifidum</i> 102	+	—	—	4,1±0,2	161,7±2,6	7,60±0,15	47
<i>B. longum</i> 139	—	—	—	4,2±0,2	161,7±2,6	12,40±0,05	5
<i>B. bifidum</i> 142	—	—	—	1,7±0,1	216,7±2,6	8,60±0,02	9
<i>B. longum</i> 143	—	—	—	1,1±0,1	181,7±2,6	1,76±0,09	5
<i>B. longum</i> 144	+	—	—	1,3±0,1	183,3±2,6	34,70±0,02	40
<i>B. longum</i> 145	—	—	—	1,0±0,0	218,3±6,8	2,93±0,17	38
<i>B. bifidum</i> 152	+	—	—	4,1±0,2	180,0±0,0	13,73±0,05	9
<i>B. bifidum</i> 174	+	—	—	4,5±0,2	143,3±2,6	14,40±0,08	2
<i>B. bifidum</i> 175	+	—	—	0,9±0,1	181,7±2,6	4,20±0,03	—6
<i>B. catenulatum</i> 460	+	—	—	1,9±0,1	203,3±5,2	27,31±0,01	—10
<i>Bifidobacterium sp.</i> 271	+	—	—	4,5±0,1	203,3±5,2	34,80±0,05	63
<i>B. bifidum</i> 272	+	—	—	4,3±0,2	165,0±4,5	9,80±0,02	70
<i>B. longum</i> 276	+	—	—	2,1±0,1	211,7±2,6	8,50±0,05	0
<i>B. bifidum</i> 278	+	—	—	4,1±0,2	153,3±2,6	28,70±0,14	6
<i>Lactobacillus sp.</i> 25A	+	+	±	4,1±0,1	241,7±2,6	11,80±0,09	6
<i>Lactobacillus sp.</i> 62A	+	±	—	1,6±0,0	218,3±2,6	3,30±0,17	—43
<i>Lactobacillus sp.</i> 75A	+	±	±	1,8±0,1	213,3±5,2	5,70±0,08	46
<i>Lactobacillus sp.</i> 76A	+	±	±	1,8±0,1	216,7±5,2	22,50±0,03	—27
<i>Bifidobacterium sp.</i> 81Д	+	±	±	2,0±0,0	201,7±2,6	9,90±0,02	—33
<i>Bifidobacterium sp.</i> 82Д	+	+	±	4,6±0,1	211,7±2,6	17,21±0,01	6
<i>B. bifidum</i> 34s	+	+	±	4,7±0,1	183,3±2,6	28,30±0,03	53
<i>B. bifidum</i> 35s	+	±	—	0,7±0,0	191,7±2,6	25,60±0,09	30
<i>B. dentium</i> 47s	+	+	±	4,3±0,2	203,3±5,2	7,61±0,01	31
<i>Bifidobacterium sp.</i> 50s	+	+	±	0,7±0,0	211,7±2,6	18,10±0,08	36
<i>B. dentium</i> 51s	+	±	—	0,5±0,0	136,7±2,6	11,30±0,14	—111
<i>Bifidobacterium sp.</i> 52s	+	±	±	0,8±0,0	150,0±4,5	5,17±0,03	30
<i>B. dentium</i> 53s	+	±	—	1,3±0,1	158,3±2,6	4,60±0,02	—163
<i>B. dentium</i> 55s	+	—	—	4,0±0,0	161,7±2,6	15,21±0,01	0
<i>B. dentium</i> 69s	+	±	—	2,2±0,1	150,0±4,5	9,70±0,08	—122
<i>B. bifidum</i> 77s	+	+	+	3,8±0,2	198,3±2,6	8,16±0,09	75
<i>B. dentium</i> 66/2s	+	±	—	3,5±0,1	181,7±6,9	9,70±0,01	—150
<i>B. dentium</i> 66/3s	+	±	—	4,7±0,2	141,7±2,6	9,40±0,03	55

* — Штам *Lactobacillus sp.* 25A витримував двогодинну експозицію в умовах шлунку. Решта штамів — чутливі.

** — «+» — активний ріст, «±» — слабкий ріст, «—» — відсутність росту. $p \leq 0,05$



При вивченні гідрофобності клітини досліджуваних штамів було встановлено, що дана властивість має штамову специфічність (як і адгезивна активність), але при цьому не було встановлено взаємозв'язку між цими властивостями у досліджуваних штамів (табл. 2).

Під час селекції пробіотичних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій необхідно також враховувати і технологічні критерії відбору штамів [8]. Зокрема, штами, перспективні для створення біопрепарату, повинні мати високу швидкість росту та кислотоутворювальну активність. За даними літератури, промислово перспективний штам повинен максимально накопичувати мікробну біомасу до 12–24 год культивування та мати активність кислотоутворення не нижчу за 90 °Т для біфідобактерій та не нижчу за 200 °Т для лактобацил [9].

Вивчення досліджуваних штамів за цими ознаками показало, що активність кислотоутворення у всіх досліджуваних штамів була високою і варіювала в широкому діапазоні значень від 140 до 240 °Т. Найактивнішими кислотоутворювачами виявилися штами *Lactobacillus sp.* 25А (активність кислотоутворення 241,7±2,6 °Т), штами *Lactobacillus sp.* 76А, *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 142, *B. longum* 145 (218,3±6,9, 216,7±2,6 та 218,3±6,8 °Т відповідно), *B. longum* 276 (211,7±2,6 °Т) та *Bifidobacterium sp.* 271 (203,3±5,2 °Т).

Первинний скринінг досліджуваних штамів біфідобактерій і молочнокислих бактерій за показником швидкості росту дозволив виявити 14 культур, здатних накопичувати необхідну кількість біомаси, а саме — понад 10⁹ КУО/мл за 24 год культивування (табл. 2).

Оскільки пробіотичні препарати часто використовуються на фоні антибіотикотерапії при лікуванні хвороб різної етіології, було актуальним вивчити відношення досліджуваних штамів до широкого спектру антимікробних препаратів, зокрема антибіотиків. Результати дослідження представлені в таблиці 3.

Більшість досліджуваних штамів виявилися чутливими до широкого спектру антибіотиків: пиперациліну (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), карбеніциліну (окрім *Bifidobacterium sp.* 52s), бензилпеніциліну (окрім *B. dentium* 51s та *Lactobacillus sp.* 25А), цефалексину (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), цефатоксиму, цефепіму (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), кліндаміцину (окрім *B. dentium* 51s), лінкоміцину, рокситроміцину, еритроміцину (окрім *B. dentium* 69s n1 66/2), офлоксацину, ванкоміцину (окрім штаму *Lactobacillus sp.* 76А та *Lactobacillus sp.* 25А), хлорамфеніколу, рифампіцину та іміпенему (окрім *B. dentium* 51s).

Усі досліджувані штами виявили стійкість лише до двох антибіотиків — нетілміцину (в анаеробних умовах вирощування така стійкість до аміноглікозидних препаратів є природною для біфідобактерій та молочнокислих бактерій) та норфлоксацину.



Таблиця 3

Відношення досліджуваних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій до антибіотиків

Table 3

Relation of the studied strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria to antibiotics

Штам	Карбеніцилін	Оксацілін	Бензилпеніцилін	Цефепім	Кліндаміцин	Тетрациклін	Фузидин	Рокситроміцин	Еритроміцин	Ванкоміцин	Рифампіцин	Іміпенем	Флуконазол	Клотримазол
	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. animalis subsp. lactis</i> 99	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 102	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 139	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 142	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 143	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 144	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. longum</i> 145	ч	р	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 152	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 174	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. bifidum</i> 175	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. catenulatum</i> 460	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 271	ч	р	ч	ч	ч	р	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 272	ч	р	ч	ч	ч	р	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 276	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 278	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 25A	ч	р	сч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 62A	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 75A	ч	ч	ч	ч	ч	р	сч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 76A	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	р	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 81Д	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
<i>Bifidobacterium sp.</i> 82Д	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
<i>B. bifidum</i> 34s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 35s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 47s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 50s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 51s	ч	ч	р	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 52s	р	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч
<i>B. dentium</i> 53s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 55s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 69s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. bifidum</i> 77s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 66/2s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. dentium</i> 66/3s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р

Примітка: до нетилміцину, норфлоксацину, офлоксацину усі штами резистентні, до піперациліну, цефатоксиму, цефалексину, лінкоміцину, хлорамфеніколу, нітрофурантоїну — чутливі.

ч — чутливі, сч — середньочутливі, р — резистентні.



До решти препаратів досліджувани штамми виявили різне відношення в залежності від штаму. Штами *B. dentium* 51s та *Lactobacillus sp.* 25A були стійкі до широкого спектру антимікробних препаратів. Відношення досліджуваних штамів до антибіотиків не залежало ні від джерела їх виділення, ні від виду мікроорганізму. Зокрема, наше припущення щодо стійкості досліджуваних штамів, виділених від хворих на пневмонію дітей, до більш широкого спектру антимікробних препаратів (як наслідок контакту даних штамів з препаратами і набутої резистентності) не підтвердилося. Спираючись на дані літератури, можна зробити висновок, що відношення досліджуваних культур до антибіотиків носить штамоспецифічний характер.

Необхідно зазначити, що значна частина досліджуваних штамів була чутливою до антифунгальних препаратів — клотримазолу та флуконазолу. Хоча їх фармакологічна дія направлена на пригнічення синтезу клітинної стінки грибів, ці препарати можуть проявляти інгібуючу активність і проти представників нормальної мікробіоти кишечника людини. Даний факт обов'язково слід враховувати при проведенні антифунгальної терапії.

Усі досліджувані штамми не виявили гемолітичної активності на Колумбія-агарі з 5% овечої крові (дані не наведені).

Таким чином, вивчення біологічної активності біфідобактерій та молочнокислих бактерій показало, що досліджені культури є досить чутливими до умов шлунково-кишкового тракту, особливо до низьких значень рН середовища. Штами, виділені від дорослих людей, є більш толерантними до присутності жовчі, у порівнянні з штамми, ізольованими від дітей. Цей факт означає, що при створенні пробіотичних препаратів варто враховувати вікову категорію людей, тобто при створенні пробіотика для людей середнього та похилого віку слід обирати штамми, виділені від людей даного віку.

Отримані нами результати свідчать про чутливість досліджуваних штамів до широкого спектру антибіотичних препаратів. Відношення біфідобактерій до окремих антибіотиків не залежить від джерела виділення і варіює в залежності від штаму. Усі досліджувані штамми виявилися активними кислотоутворювачами, що, ймовірно, і пояснює здатність досліджуваних культур пригнічувати ріст небажаної мікробіоти.

Проведений скринінг досліджуваних культур біфідобактерій і молочнокислих бактерій дозволив рекомендувати *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 та *B. bifidum* 278 як перспективні для створення пробіотиків для дітей, а штамми *Lactobacillus sp.* 25A, *Bifidobacterium sp.* 82Д та *B. bifidum* 34s — для створення пробіотиків для людей середнього та похилого віку. Дані штамми є антагоністами широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів, активно адгезують до клітин макроорганізму, відрізняються високою швидкістю росту і активністю кислотоутворення. Крім того, штамми, ізольовані від дорослих людей, є толерантними до присутності фізіологічної концентрації жовчі



у середовищі та низьких значень рН (штам *Lactobacillus sp.* 25A), що відповідає необхідним вимогам ВООЗ до пробіотичних препаратів [2].

У подальших дослідженнях виявлення конкретних молекулярних елементів, що зумовлюють пробіотичний ефект (такі як біологічно активні пептиди, олігоцукри, ферменти, вільні амінокислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, вітаміни та ін.) буде слугувати ключовим фактором для відбору пробіотичних штамів.

Автори висловлюють щирю вдячність науковому співробітникові відділу фізіології промислових мікроорганізмів ІМВ НАНУ Зелений Л.Б. за проведення генетичної ідентифікації досліджуваних штамів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание // Сборник материалов Международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». — Москва (Россия). — 2004. — С. 12–14.
2. *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.
3. Коваленко Н.К., Полтавская О.А., Зеленая Л.Б. Видовой состав бифидобактерий пищеварительного тракта людей различных возрастных групп в норме и патологии // Микробиол. журн. — 2011. — № 6. — (у друку)
4. Matto J., Malinen E., Suihko M.-L. et al. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria // J. Appl. Microbiol. — 2004. — V.97. — P. 459–470.
5. Коваленко Н.К., Лівінська О.П., Полтавська О.А., Гармашева І.Л., Шинкаренко Л.М., Олещенко Л.Т. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і біфідобактерій // Мікроб. журнал. — 2010. — Т. 72, № 1. — С. 5–17.
6. Choo S.Y., Choi I.H., Kim J.D. Bacterial Adherence to Human Buccal Epithelial Cells and Its Possible Role in Bacterial Colonization in Human Oral Cavity // Yonsei Medical Journal. — 1982. — V. 23, № 1. — P. 26–29.
7. Peretz P.F., Minnaard J., Disalvo E.A., Antoni G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64, № 1. — P. 21–26.
8. Charteris W.P., Kelli P.M., Morelli L. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* species // Letters in Applied Microbiology. — 1998. — Vol. 26, № 1. — P. 333–337.
9. Charteris W.P., Kelli P.K., Morelli L., Collins J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional foods // Int. J. of Dairy Techn. — 1998. — Vol. 51, № 4. — P. 23–37.



О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко, И.Г. Успенский

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д 03143, Украина,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

СКРИНИНГ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И БИФИДОБАКТЕРИЙ ПО ПРОБИОТИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ

Реферат

В результате скрининга, проведенного в соответствии с современными требованиями ВОЗ, отобраны штаммы бифидобактерий *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 и *B. bifidum* 278 как перспективные для создания пробиотиков для детей, а штаммы *Lactobacillus sp.* 25А, *Bifidobacterium sp.* 82Д и *B. bifidum* 34s — для создания пробиотиков для людей среднего и пожилого возраста.

Ключевые слова: бифидобактерии, молочнокислые бактерии, адгезия, чувствительность к антибиотикам, скрининг, пробиотики.

O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko, I.G. Uspenskyi

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny Str.,
Kyiv, D 03143, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

SCREENING OF LACTOBACTERIA AND BIFIDOBACTERIA STRAINS BY PROBIOTIC PROPERTIES

Summary

As a result of screening carried out in accordance with modern requirements of WHO, strains of bifidobacteria *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 and *B. bifidum* 278 have been selected as promising to create the probiotics for children, and strains of *Lactobacillus sp.* 25A, *Bifidobacterium sp.* 82D and *B. bifidum* 34s — for creation of the probiotics for the middle-aged and elderly.

Keywords: bifidobacteria, lactic acid bacteria, adhesion, sensitivity to antibiotics, screening, probiotics.

