

УДК 579.86:612.215.4:57.083(043.3)

¹Коротких О. О., ¹Калініченко С. В., ²Дубініна Н. В.

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАЦИЛ ЗА АЕРОБНИХ ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНИХ УМОВ АТМОСФЕРИ ІНКУБАЦІЇ

¹Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова

Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

²Національний фармацевтичний університет МОЗ України (м. Харків)

kalinichenko_sv@ukr.net

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль», № держреєстрації 0113U001517.

Вступ. Пробиотичні препарати розглядаються найбільш перспективними засобами проти антибіотикорезистентних субпопуляцій патогенних бактерій. Вони знаменують початковий етап підвищення ефективності етіотропної терапії. Поки що пробиотики значно уступають за ефективністю протимікробним засобам, проте вони можуть проявляти інший механізм впливу на життєдіяльність патогенних бактерій.

Для корекції дисбіотичних станів урогенітального і травного трактів найчастіше використовуються пробиотики, до складу яких входять лактобацили. Що стосується застосування пробиотиків на основі лактобацил для відновлення нормофлори верхніх дихальних шляхів, то таких відомостей в доступній нам літературі ми не зустріли, хоча лактобацили відносяться до облигатних представників мікрофлори людини та більшою чи меншою мірою присутні в усіх відкритих порожнинах організму. Їх видовий склад дуже різноманітний [1, 3, 4, 8, 10, 14]. Зазначене надає можливість пошуку й відбору кандидатів у виробничі штами серед представників альтернативних еконіш.

Умови в біологічних нішах людського організму можуть суттєво відрізнятися від створених *in vitro* за багатьма параметрами, у тому числі і за газовим складом атмосфери інкубації [13].

Виходячи з вищезазначеного нами була поставлена наступна **мета**: провести вивчення біологічних властивостей перспективних штамів *Lactobacillus* spp. за умов різної концентрації кисню в атмосфері їх культивування.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами дослідження були штами *Lactobacillus* spp. (пробиотичні та виділені від людей і бджіл) й «назальні» штами *Staphylococcus aureus*, виділені від хворих на хронічні форми ЛОР-патології (риніт і синусит) і бактеріоносіїв *S. aureus* (2012-2014 рр.), що циркулюють у Харківському регіоні (клінічні штами).

Мікроаерофільні умови культивування створювали у мікроанаеростатах за допомогою газогенерую-

чих пакетів Generator GENbox microaer (bioMerieux, Франція).

Вплив умов газового складу атмосфери культивування на ростові властивості вивчали, враховуючи приріст кількості життєздатних мікробних клітин та біомаси за визначений час [9].

Визначення кількості окисненої глюкози проводили за допомогою глюкозоксидазного методу [11].

Дослідження антагоністичної активності мікроорганізмів проводили методом відстрочених посівів (перпендикулярних штрихів) [6].

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики, як викладено у посібниках [2, 5, 7, 12]. Для аналізу одержаного матеріалу проводилось його групування за атрибутивними та варіаційними ознаками. У результаті зведення матеріалу при підрахунках одиниць спостережень були отримані абсолютні числа, які виражали описові і кількісні ознаки.

Результати досліджень та їх обговорення.

Першим етапом дослідження стало вивчення метаболічної активності та ростових властивостей лактобацил.

Відомо, що рівень метаболічних процесів являється вихідним показником спроможності мікроорганізмів активно розвиватися. Метаболізм потребує постійного і безперервного притоку енергії, універсальним джерелом якої для більшості організмів є глюкоза. Тобто, визначення кількості утилізованої глюкози та швидкості її утилізації може служити показником потенційної швидкості розвитку субпопуляції.

Виходячи з вищезазначеного, спочатку було вивчено рівень ферментативних процесів (кількість спожитої лактобацилами глюкози), який є вихідним показником потенційної спроможності клітин активно розвиватися.

У ході проведених досліджень встановлено, що мікроаерофільні умови сприяли підвищенню кількості спожитої лактобацилами глюкози (**табл.**).

Так, за умов зниженого парціального тиску кисню кількість спожитої лактобацилами глюкози збільшувалась, в середньому, у пробиотичних штамів – в 1,2 рази, а у клінічних – в 1,3 рази ($p < 0,05$).

Отримані результати щодо стимуляції процесу споживання глюкози лактобацилами, можливо,

Середня кількість спожитої лактобацилами глюкози за різних умов культивування

Умови культивування	Кількість спожитої глюкози, ммоль/л (M±m)		
	Lactobacillus spp. (пробіотичні), n=7	Lactobacillus spp. (від людей), n=17	Lactobacillus spp. (від бджіл), n=9
Аеробні	13,1±0,16*	11,2±0,17*	12,6±0,17*
Мікроаерофільні	15,9±0,21*	14,8±0,23*	16,8±0,26*

Примітка: * - різниця достовірна (p<0,05) за різних умов культивування.

пов'язані із зміною швидкості метаболічних процесів за умов дефіциту кисню.

Наступним етапом стало вивчення ростових властивостей лактобацил за різних умов газового складу атмосфери культивування. Зміни ростових властивостей визначались у аеробних умовах культивування та за умов зниженого парціального тиску кисню у лактобацил з високим рівнем споживання глюкози: *L. plantarum* (виділений від бджіл), *L. rhamnosus* GG (виділений з пробіотика) та *L. casei* (виділений від людини).

У ході досліджень було відмічено, що показники ростових процесів досліджених бактерій хоча і відрізнялись у деяких штамів (штам *L.*

plantarum, ізолюваний з кишечника бджіл, мав більш активні ростові властивості), але мали спільні тенденції змін ростових властивостей (рис. 1).

Експоненціальна фаза росту, в середньому, знаходилась в межах 2-12 годин. Пробіотичний штам був менш активним у порівнянні з іншими.

Динаміка росту всіх штамів лактобацил за умов мікроаерації була вищою у порівнянні з аеробними умовами культивування. Проте, мікроаерофільні умови культивування не впливали на тривалість лаг-фази усіх досліджених штамів лактобацил.

Найбільші відмінності в показниках, за різних умов газового складу атмосфери інкубації, були відмічені для експоненціальної фази та фази стаціонарного росту лактобацил.

У пробіотичного штаму показники відрізнялись в 1,2-1,4 рази (p<0,05). Така ж тенденція була відмічена і для штаму, ізолюваного від людини. Різниця між показниками росту, за різних умов газового складу атмосфери культивування, у цього штаму відрізнялась в 1,2-1,6 разів (p<0,05). Найбільш активними за накопиченням біомаси був штам, ізолюваний з кишечника бджіл. За різних

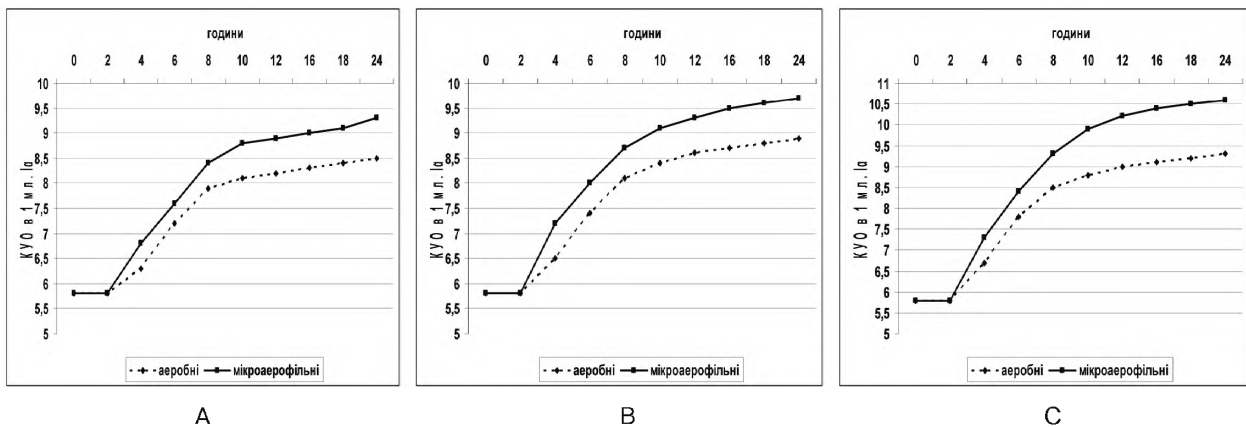


Рис. 1. Схеми росту лактобацил за аеробних та мікроаерофільних умов культивування (А – *L. rhamnosus* GG, В – *L. plantarum*, С – *L. casei*).

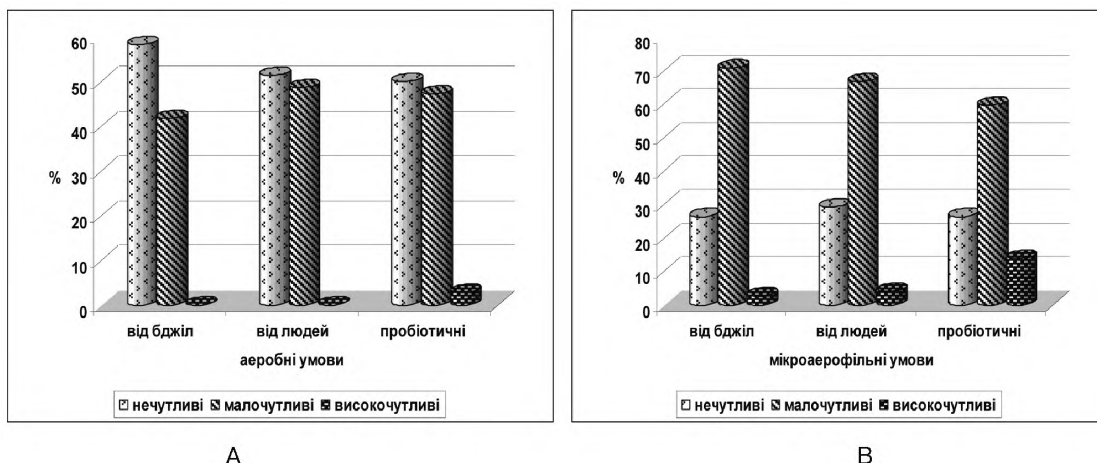


Рис. 2. Питома вага стафілококів з різною чутливістю до антагоністичних речовин лактобацил (А – аеробні умови культивування; В – мікроаерофільні умови культивування).

умов аерації різниця між показниками їх зростання відрізнялась в 1,2- 1,8 разів ($p < 0,05$).

Наступним етапом досліджень стало вивчення конкурентних властивостей зазначених лактобацил методом відстроченого антагонізму щодо «назальних» штамів *S. aureus*.

Результати вищенаведених змін у взаємовідносинах *S. aureus* та *Lactobacillus* spp. за мікроаерофільних умов культивування ілюстровані на **рисунку 2**, де можна побачити достовірне ($p < 0,05$) зменшення питомої ваги нечутливих та збільшення частки високочутливих тест-штамів стафілококів у порівнянні з аеробними умовами культивування.

На наш погляд, отримані результати, можуть бути обумовлені тим, що лактобацили, в більшості, є мікроаерофілами. Тобто, більш сприятливими умовами для їх росту і продукуванню біологічно активних речовин є атмосфера з підвищеним вмістом

вуглекислого газу та зниженим парціальними тиском кисню.

Висновок. Експериментальні результати щодо вивчення ростових та антагоністичних властивостей тест-культур лактобацил за аеробних та мікроаерофільних умов атмосфери культивування надають можливість вивчати міжмікробну взаємодію в тканинах людини при запальних процесах верхніх дихальних шляхів та розкривають можливість використовувати лактобацили для боротьби з захворюваннями стафілококового генеза.

Перспективи подальших досліджень. Викладене обґрунтовує актуальність наукового завдання щодо необхідності цілеспрямованого пошуку перспективних штамів *Lactobacillus* spp. як альтернативи антибіотиків.

Література

1. Bondarenko V.M. Analiz profilakticheskogo i lechbnogo dejstviya probioticheskikh preparatov s pozitizij novih nauchnih tehnologij / V.M. Bondarenko // J. micribiol. – 2015. — № 2. – S. 90-104.
2. Borovikov V.P. Statistica / V.P. Borovikov, E.P. Borovikov. – M.: Filin, 1998. – 592 s.
3. Buharin O.V. Harakteristika antagonistichej aktivnosti probioticheskikh bakterij / O.V. Buharin, A.V. Semenov, S.V. Cherkasov // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapaja. – 2010. — T. 12, №. 4 — S. 347-352.
4. Valyshev A.V. Mikrobnaja ekologija / A.V. Valyshev. — Ekologija mikroorganizmov cheloveka. – Ekaterinburg: IKVS, 2006. — S. 169-290.
5. Gelman V.Ya. Medicinskaja informatika / V.Ya. Gelman. – SPb.: Piter, 2002. – 480 s.
6. Egorov N.S. Mikrobi-antagonisti s metodi opredelenija aktivnosti / N.S. Egorov. – M.: Visshaja shkola, 1965. – 211 s.
7. Lapach S.N. Statisticheskie metodi v medico-biologicheskikh issledovanijah / S.N. Lapach. – K.: Morion, 2000. – 320 s.
8. Mediczna mikrobiologija, virusologija ta imunologija / za red. V.P. Shirobokova. – Vinnizja: Nova kniga, 2011. – 952 s.
9. Metodi poshuku perspektivnih shtamiv mikroorganizmiv. Metodichni rekomendazii / E.M. Babich [ta in.]. – Kiev, 2016. – 30 s.
10. Mokrozub V.V. Antibakterialni i imunomodulvalni vlastivosti lakto i bifidobakterij / V.V. Mokrozub // Biotehnologija. – 2012. – T. 5, № 2. – S. 98-105.
11. Pat. № 74763 UA, MPK C12N1/20 (2006.01) C12N1/26 (2006.01) Sposib viznachennja katabolichnoi aktivnosti mikroorganizmiv / zajavnik i patentovlasnik DU "IMI NAMN". – № u 20 12 04944; zajavl. 20.04.2012; opubl. 12.11.2012. — Bul. № 21, 2012 s.
12. Prikladnaja medicinskaja statiatika / pod red. V.M. Zajceva, V.G. Lifjandskogo. – SPb.: SPbGMA, 2000. – 299 s.
13. Pizkova T.A. Mikrobiologichna harakteristika mikroflori migdalikiv, Corynebacterium diphtheriae ta osoblivosti mizbakterialnih vzaemovidnosin za aerobnih ta mikroaerofilnih umov: avtoref. dis. zdobuttja kand. med. nauk: spec. 03.00.07 «Mikrobiologija» / Pizkova Tetjana Anatoliivna. — Harkiv, 2009. – 24 s.
14. Rammelsberg M. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei* [Text] / M. Rammelsberg, E. Myller, F. Radler // Archives of Microbiology. – 1990. – V. 154, № 3. – P. 249-252.

УДК 579.86:612.215.4:57.083(043.3)

ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАЦИЛ ЗА АЕРОБНИХ ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНИХ УМОВ АТМОСФЕРИ ІНКУБАЦІЇ

Коротких О. О., Калініченко С. В., Дубініна Н. В.

Резюме. У роботі наведено дані щодо вивчення газового складу атмосфери культивування на ростові та антагоністичні властивості лактобацил, вилучених з різних еконіш. Встановлено, що динаміка росту та кількість спожитої лактобацилами глюкози у всіх досліджених штамів лактобацил за умов мікроаерації була вищою у порівнянні з аеробними умовами культивування.

При вивченні антагоністичних властивостей лактобацил за аеробних та мікроаерофільних умов культивування встановлено, що за мікроаерофільних умов культивування відбувалось достовірне ($p < 0,05$) зменшення питомої ваги нечутливих та збільшення частки високочутливих штамів стафілококів у порівнянні з аеробними умовами культивування.

Ключові слова: пробіотики, лактобацили, *S. aureus*, мікроаерація.

УДК 579.86:612.215.4:57.083(043.3)

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАЦИЛЛ В АЭРОБНЫХ И МИКРОАЭРОФИЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Коротких Е. О., Калиниченко С. В., Дубинина Н. В.

Резюме. В работе приведены данные по изучению газового состава атмосферы культивирования на ростовые и антагонистические свойства лактобацилл, выделенных из разных эконіш. Установлено, что динамика роста и количество потребленной лактобациллами глюкозы (у всех исследованных штаммов) в условиях

микроаэрации была выше по сравнению с аэробными условиями культивирования. При изучении антагонистических свойств лактобацилл в аэробных и микроаэрофильных условиях культивирования установлено, что при микроаэрофильных условиях культивирования происходило достоверное ($p < 0,05$) уменьшение удельного веса нечувствительных и увеличение доли высокочувствительных (по отношению к биологически активным веществам лактобацилл) штаммов стафилококков по сравнению с аэробными условиями культивирования.

Ключевые слова: пробиотики, лактобациллы, *S. aureus*, микроаэрация.

UDC 579.86:612.215.4:57.083(043.3)

CHARACTERISTICS OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLES IN THE AEROBIC AND MICROAEROPHILIC CONDITIONS OF CULTIVATION

Korotkykh O. O., Kalinichenko S. V., Dubinina N. V.

Abstract. To correct the dysbiotic conditions of the urogenital and gastric tracts, probiotics are most often used, which include lactobacilli. As for the use of probiotics based on lactobacilli to restore normal flora of the upper respiratory tract, we did not find such information in the literature available to us, although lactobacilli are among the obligate representatives of the human micro flora and are, to a greater or lesser extent, present in all open cavities of the body. This allows to search and select candidates for production strains among representatives of alternative niches. The conditions in the biological niches of the human body can differ significantly from those created in vitro by many parameters, including the gas composition of the incubation atmosphere.

That is why we set the following goal: to conduct a study of the biological properties of promising strains of *Lactobacillus spp.* under conditions of different concentrations of oxygen in the atmosphere of their cultivation.

The first stage of the study was to explore of metabolic activity and growth properties of lactobacilli.

It is known that the level of metabolic processes is the initial indicator of the ability of microorganisms to actively develop. Metabolism requires a constant and continuous influx of energy, the universal source of which for most organisms is glucose. That is, determining the amount of recycled glucose and the rate of its utilization can serve as an indicator of the potential rate of development of subpopulations. Based on the foregoing, the level of enzymatic processes (the amount of glucose consumed by lactobacilli) was first studied, which is the initial indicator of the potential ability of cells to actively develop.

In the course of the conducted researches it was established that the micro-aerophilic conditions contributed to an increase in the amount of glucose consumed by lactobacilli. Thus, under conditions of reduced partial pressure of oxygen, the amount of glucose consumed by lactobacilli increased, on average, in probiotic strains - by 1,2 times, and in the cells - by 1,3 times ($p < 0,05$).

The results obtained to stimulate the process of glucose consumption by lactobacilli, possibly associated with a change in the rate of metabolic processes in conditions of oxygen deficiency.

The next stage was the study of the growth properties of lactobacilli under various conditions of the gas composition of the atmosphere of cultivation. Changes in growth properties were determined under aerobic conditions of cultivation and under conditions of reduced partial oxygen pressure in lactobacilli with a high level of glucose consumption: *L. plantarum* (isolated from bees), *L. rhamnosus* GG (isolated from a probiotic) and *L. casei* (isolated from humans). In the course of the studies, it was noted that the growth rates of the explored bacteria, although differing in some strains (strain *L. plantarum*, isolated from the intestines of bees, had more active growth properties), but had general trends of changes in growth properties. The exponential phase of growth, on average, was within 2-12 hours. The probiotic strain was less active than others.

The growth dynamics of all strains of lactobacilli under microaeriation conditions was higher in comparison with aerobic cultivation conditions. However, microaerophilic cultivation conditions did not affect the duration of the lag phase of all the studied strains of lactobacilli.

The biggest differences in the indices, under different conditions of the gas composition of the incubation atmosphere, were noted for the exponential phase and the phase of steady growth of lactobacilli.

In the probiotic strain, the indices differed by 1.2-1.4 times ($p < 0.05$). The same tendency was noted for a strain isolated from humans. The difference between the growth indices, under different conditions of the gas composition of the cultivation atmosphere, differed 1.2-1.6 times ($p < 0.05$) in this strain. The most active in the accumulation of biomass was a strain isolated from the intestines of bees. Under different aeration conditions, the difference between the indices of their growth was 1.2-1.8 times ($p < 0.05$).

The next stage of the research was the study of the competitive properties of these lactobacilli by the method of delayed antagonism on the "nasal" strains of *S. aureus*.

Under microaerophilic culture conditions, there was a significant ($p < 0.05$) decrease in the specific gravity of insensitive and an increase in the proportion of highly sensitive test strains of staphylococci compared to aerobic cultivation conditions.

Thus, experimental results on the growth and antagonistic properties of lactobacillus test cultures under aerobic and microaerophilic conditions of the cultivation atmosphere provide an opportunity to study the microbial interaction in human tissues in the inflammatory processes of the upper respiratory tract and disclose the use of lactobacilli for the control of diseases of staphylococcal origin.

Keywords: probiotics, lactobacilli, *S. aureus*, microaeriation.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 14.06.2017 року