

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ЛАКТОБАКТЕРІЙ ПІСЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ТА ПОВТОРНИХ ЦИКЛІВ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДТАВАННЯ

Книш Оксана Василівна,
к. мед. н, старший науковий співробітник,
Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І. І. Мечникова
Національної академії медичних наук України»,
м. Харків, Україна

Полянська Валентина Павлівна,
к. б. н., доцент,

Зачепило Світлана Вікторівна,
к. мед. н., доцент,
Українська медична стоматологічна академія,
м. Полтава, Україна

Вступ. Корисні ефекти пробіотичних бактерій реалізуються завдяки біологічній активності їх структурних компонентів та метаболітів. Отримати деривати пробіотичних клітин можливо при застосуванні різних способів дезінтеграції, одним з яких є заморожування-відтавання. Завдяки особливостям будови і складу клітинної стінки бактерії є доволі стійкими до впливу руйнівних факторів на етапах заморожування-відтавання. Очевидно, ефективність дезінтеграції бактеріальних клітин буде залежати як від технологічних параметрів заморожування-відтавання, так і від криочутливості бактеріальної культури. Відомо, що не лише різні види, але і різні штами всередині кожного виду бактерій відрізняються чутливістю до заморожування-відтавання.

Мета роботи. Визначити кількісну та функціональну збереженість бактерій пробіотичного штаму *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 після одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання.

Матеріали і методи. В роботі використано пробіотичний штам *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 з БАД «БіоГая ОПС» (BioGaia Production AB,

Швеція). Ліофілізат пробіотичних бактерій піддавали регідратації та центрифугували впродовж 10 хвилин при 3000 g. Супернатант з розчиненими солями та допоміжними речовинами декантували. Осаджені бактеріальні клітини відновлювали шляхом культивування в тіогліколевому середовищі (TG, Biolife; Італія) впродовж 24 годин при 37 °С. Після перевірки чистоти культури клітини тричі відмивали стерильним фізіологічним розчином. З осаду готували бактеріальні суспензії з оптичною густиною (ОГ) 10,0 одиниць за шкалою McFarland (McF) з використанням денситометра Densi-La-Meter («PLIVA-Lachema Diagnostika», Чехія). Для досліджень використовували суспензії свіжовиділених клітин та суспензії клітин, що зберігали за гіпотермічних умов (6 ± 2) °С впродовж 24 год. Визначення кількості колонієутворюючих одиниць в одиниці об'єму суспензій (КУО/мл) лактобактерій здійснювали методом послідовних десятикратних розведень з використанням TG середовища. Заморожування суспензії пробіотичних клітин здійснювали до температури (-23 ± 1) °С впродовж чотирьох годин. Об'єм зразка становив 50 мл. Відігрівання заморожених зразків здійснювали на водяній бані за температури (37 ± 1) °С до повного відтавання. Цикли заморожування-відтавання здійснювали 1, 5 та 10 разів. Розраховували кількісні втрати життєздатних бактерій після гіпотермічного зберігання та заморожування-відтавання.

Вплив гіпотермічного зберігання та заморожування-відтавання на проліферативну активність пробіотичних бактерій досліджували спектрофотометричним методом з використанням 96-лункових полістиролових планшетів (ВАТ «Ексімкарготрейд», Україна) за наростанням ОГ суспензії клітин у триптиказо-соєвому бульйоні (HiMedia, Індія) з додаванням 1 % глюкози. Планшети із суспензіями витримували впродовж 24 годин за мікроаерофільних умов та температури 37 °С. ОГ вмісту лунок вимірювали за допомогою мікропланшетного аналізатора «Lisa Scan EM» («Erba Lachema s.r.o.», Чехія) при довжині хвилі 578 нм. Індекс пригнічення (ІП) або стимуляції

(IC) проліферації розраховували за формулою: $IP (IC) = \frac{\Delta OG - \Delta OG_{ПК}}{\Delta OG_{ПК}} \times 100 \%$, де ПК – лунки позитивного контролю, які містили клітини, що не піддавалися впливу фізичних чинників, ΔOG та $\Delta OG_{ПК}$ – наростання ОГ вмісту дослідної та контрольної лунок.

Вплив гіпотермічного зберігання та заморожування-відтавання на біоплівкоутворення пробіотичних бактерій досліджували спектрофотометричним методом Stepanovic S. et al., 2007. ОГ елюатів в дослідних і контрольних лунках вимірювали при довжині хвилі 630 нм за допомогою мікропланшетного аналізатора. На основі значень ОГ, отриманих для лунок негативного контролю (НК) і дослідних зразків, формування біоплівки визначали як: слабке ($OG_{нк} < OG \leq 2 \times OG_{нк}$); помірне ($2 \times OG_{нк} < OG \leq 4 \times OG_{нк}$); сильне ($4 \times OG_{нк} < OG$) або відсутнє ($OG \leq OG_{нк}$) згідно опису (In Lee et al., 2017). IP (або IC) біоплівкоутворення розраховували за формулою: $IP (IC) = \frac{OG - OG_{ПК}}{OG_{ПК}} \times 100 \%$, де ПК – лунки позитивного контролю, які містили клітини, що не піддавалися впливу фізичних чинників, ОГ та $OG_{ПК}$ – оптична густина вмісту дослідної та контрольної лунок.

Експерименти проводили тричі. Кожен зразок тестували в трьох повторях. Визначали середні значення отриманих показників (\bar{x}) зі стандартними відхиленнями (SD). Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Excel 2010 (Microsoft, США), яка передбачала однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) та подальше множинне порівняння за допомогою критерію Стюдента з поправкою Бонферроні,

Результати та обговорення. Найбільші кількісні втрати бактерій спостерігали після десятиразового заморожування-відтавання (термоцикловання) суспензій клітин (табл. 1). Зберігання суспензій лактобактерій за гіпотермічних умов впродовж доби супроводжувалося втратою не більше 10 % КУО і суттєво не впливало на показники втрат бактерій після термоцикловання ($p \geq 0,05$).

Таблиця 1

Показники життєздатності (Ж) та кількісних втрат (В) клітин *L. reuteri* після одноразового та повторних циклів заморожування-відтавання

Показник	Кількість циклів заморожування-відтавання					
	1		5		10	
	СВ	Г	СВ	Г	СВ	Г
Ж, lg КУО/мл	7,8 ± 0,4	7,6 ± 0,3	4,4 ± 0,4	4,7 ± 0,4	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,2
В, %	12,4 ± 5,1	14,6 ± 3,9	51 ± 8,8	47,2 ± 8,5	65,2 ± 3,2	62,9 ± 6

Примітки: СВ – суспензія свіжовиділених клітин; Г – суспензія клітин, що зберігалася за гіпотермічних умов протягом доби

Добова витримка за гіпотермічних умов призводила до зниження проліферативної активності лактобактерій на 10 – 13 % (рис. 1). Заморожування-відтавання суспензій свіжовиділених клітин один, п'ять та десять разів призводило до зниження проліферативної активності в середньому на 45; 62 та 83 %, відповідно. ІІ проліферації лактобактерій, що попередньо зберігалися за гіпотермічних умов, після одного, п'яти та десяти циклів заморожування-відтавання становили в середньому 33; 39; та 69 %, відповідно. Вони виявилися нижчими відповідних показників, розрахованих для свіжовиділених клітин ($p < 0,05$). Таким чином, попереднє добове зберігання лактобактерій в умовах гіпотермії мало позитивний ефект на збереження проліферативного потенціалу лактобактерій, підданих повторним циклам заморожування-відтавання. Пригнічення проліферативної активності бактерій після одного циклу заморожування-відтавання значно перевищувало очікуване від кількісних втрат клітин. Після повторних циклів заморожування-відтавання показники пригнічення проліферативної активності відповідали показникам кількісних втрат клітин. Це свідчило про достатньо високий рівень збереженості проліферативного потенціалу бактерій, що залишилися живими після термоциклювання.

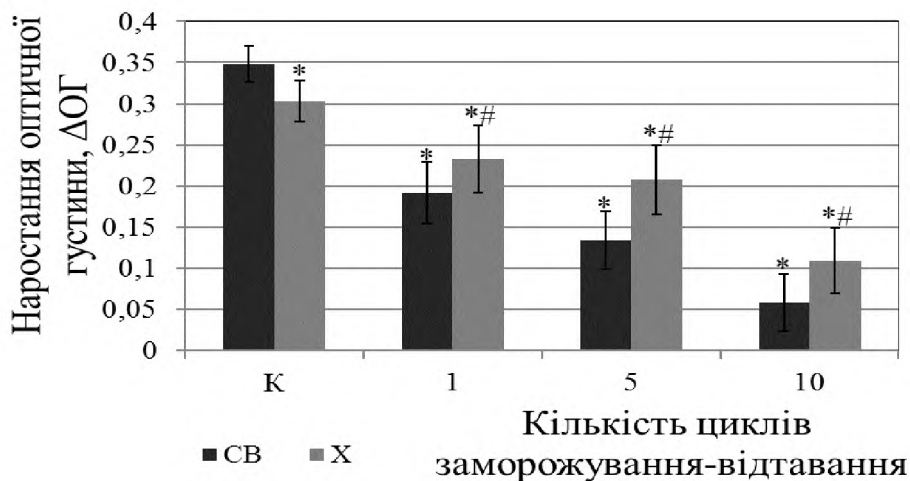


Рис. 1. Проліферативна активність лактобактерій

Примітки СВ – суспензія свіжовиділених клітин; Г – суспензія клітин, що зберігалася за гіпотермічних умов протягом доби, К – до заморожування-відтавання; відмінності статистично значущі відносно показників проліферативної активності: * – свіжовиділених клітин; # – клітин, що зберігалися впродовж доби за гіпотермічних умов, $p < 0,05$.

Біоплівкоутворення свіжовиділених лактобактерій було помірним. Як видно з представлених на рис. 2 даних, здатність лактобактерій до біоплівкоутворення після зберігання за гіпотермічних умов та одноразового заморожування-відтавання значно підвищувалася (ІС становили в середньому 50,0 і 33,3 %, відповідно). Біоплівкоутворення лактобактерій, що зберігалися за гіпотермічних умов і піддалися одноразовому заморожуванню-відтаванню, було в середньому на 27,8 % вищим, ніж свіжовиділених клітин. Після п'ятиразового заморожування-відтавання здатність лактобактерій до біоплівкоутворення дещо знижувалася, але істотно не відрізнялася від здатності до біоплівкоутворення свіжовиділених клітин. Значне зниження біоплівкоутворення спостерігалось після десятиразового термоциклоування: ІІ становили в середньому 28,7 і 30,9 % для свіжовиділених лактобактерій та клітин, що зберігалися за гіпотермічних умов, відповідно. Біоплівкоутворення ставало слабким. Але ступінь зниження біоплівкоутворення не відповідав кількісним втратам лактобактерій після відповідної кількості циклів

заморожування-відтавання і був значно меншим. Це свідчило про те, що клітини, які залишилися живими після термоциклювання, характеризувалися підвищеною здатністю до біоплівкоутворення.

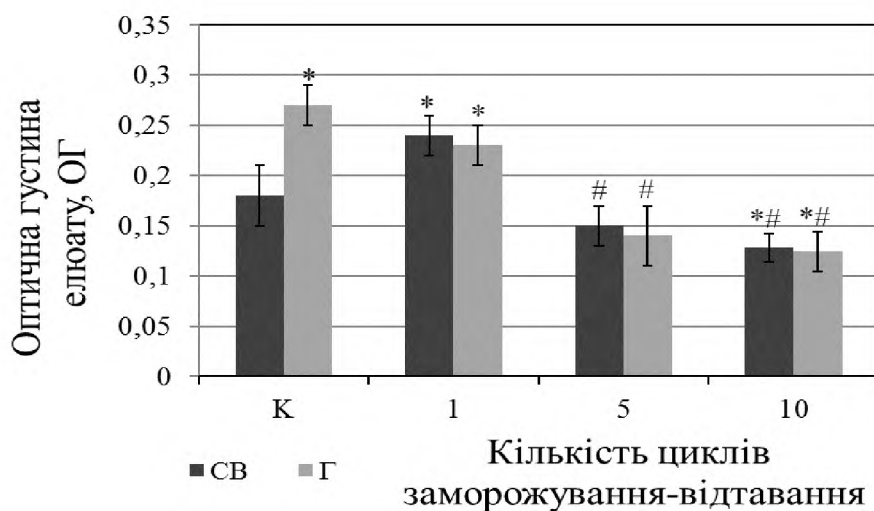


Рис. 2. Біоплівкоутворення лактобактерій

Примітки: СВ – суспензія свіжовиділених клітин; Г – суспензія клітин, що зберігалася за гіпотермічних умов протягом доби, К – до заморожування-відтавання; відмінності статистично значущі відносно показників біоплівкоутворення: * – свіжовиділених клітин; # – клітин, що зберігалися впродовж доби за гіпотермічних умов, $p < 0,05$.

Висновки. Зберігання за гіпотермічних умов та одноразове заморожування-відтавання супроводжуються значним пригніченням проліферативної активності лактобактерій і посиленням утворення ними біоплівок. Це свідчить про те, що зазначені умови сприяють переходу бактерій від планктонної до біоплівкової форми існування. Десятиразове заморожування-відтавання (термоциклювання) не призводить до втрати всіх життєздатних клітин. Бактерії, які пережили термоциклювання (~ 35 %), характеризуються збереженою здатністю до проліферації та підвищеною здатністю до утворення біоплівок. Попереднє зберігання лактобактерій за умов гіпотермії має позитивний ефект на збереження проліферативного потенціалу лактобактерій після повторних циклів заморожування-відтавання.