

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

Навчально-наковий інститут біології, хімії та біоресурсів

**Можливість сумісного культивування
пропіоновокислих та молочнокислих бактерій
в уніфікованих поживних середовищах**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, групи 407

спеціальності 162 _Біотехнології та біоінженерія

Штогрин Н.А.

Керівник: к.б.н., доцент **Васіна Л.М.**

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „__” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці–2023

Анотація

Аналізували можливість сумісного культивування представників родів *Propionibacterium*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* на комплексних уніфікованих середовищах з кукурудзяним та дріжджовим екстрактом.

Встановлено, що дані поживні середовища є ефективними для монокультивування пропіоновокислих бактерій та лактобацил. При цьому відзначали не лише збільшення показників оптичної густини пропіоновокислих бактерій (у 3 рази), а й посилення кислотоутворення (в середньому у 2 рази).

Доведено можливість сумісного культивування молочнокислих та пропіоновокислих бактерій шляхом створення асоціацій двох типів.

Зафіксовано антагоністичні властивості як індивідуальних культур, так і асоціацій стосовно грампозитивних, грамнегативних бактерій, мікроскопічних грибів.

Дослідження проводили у 2022-2023 роках на кафедрі біохімії та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

Ключові слова: *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, асоціації, сумісне культивування, уніфіковані поживні середовища.

Abstract

The possibility of co-cultivation of representatives of the genera *Propionibacterium*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on complex unified media with corn and yeast extract was analyzed.

It was established that these nutrient media are effective for monocultivation of propionic acid bacteria and lactobacilli. At the same time, they noted not only an increase in the optical density of propionic acid bacteria (by 3 times), but also an increase in acid formation (on average by 2 times).

The possibility of simultaneous cultivation of lactic acid and propionic acid bacteria by creating associations of the two types has been proven.

The antagonistic properties of both individual cultures and associations against gram-positive, gram-negative bacteria, and microscopic fungi have been recorded.

The research was conducted in 2022-2023 at the Department of Biochemistry and Biotechnology of the Educational and Scientific Institute of Biology, Chemistry and Bioresources of the Yuri Fedkovich Chernivtsi National University.

Key words: *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, associations, co-cultivation, unified nutrient medium.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

(підпис) Н.А. Штогрин

Зміст

ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Загальна характеристика пробіотиків.....	7
1.2. Характеристика пропіоновокислих бактерій та їх метаболітів	10
1.2.1. Морфологічні та біохімічні ознаки роду <i>Propionibacterium</i>	10
1.2.2. Пробіотичні та антимікробні властивості пропіоновокислих бактерій	13
1.3. Властивості молочнокислих бактерій як біологічних агентів	18
1.3.1. Особливості організації та життєдіяльності представників родів <i>Lactobacillus</i> та <i>Bifidobacterium</i>	18
1.3.2. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій	21
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
2.1. Індивідуальне вирощування пробіотичних культур на елективних середовищах.....	24
2.2. Створення модифікованого поживного середовища для <i>Propionibacterium</i>	25
2.3. Створення модифікованих уніфікованих поживних середовищ для досліджуваних культур мікроорганізмів	26
2.4. Індивідуальне вирощування культур на двох типах уніфікованих поживних середовищ	27
2.5. Створення асоціацій двох типів на основі лактобацил, біфідо- та пропіоновокислих бактерій.....	28
2.6. Дослідження антагонізму	29
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	30
3.1. Оцінка показників оптичної густини за різних умов культивування.....	30
3.2. Аналіз вмісту органічних кислот у досліджуваних культурах	32
3.3. Оцінка виживаності мікроорганізмів при моно- та ко-культивуванні.....	35
3.4. Дослідження антагонізму індивідуальних культур та асоціацій	37
ВИСНОВКИ:	41
СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	41
ДОДАТКИ	47

ВСТУП

Пробіотичні мікроорганізми – це живі непатогенні, нетоксигенні мікроорганізми, що надходять в кишечник з їжею та позитивно впливають на організм, нормалізуючи склад і біологічну активність мікрофлори травного тракту.

Молочнокислі бактерії посідають чільне місце серед мікроорганізмів, які входять до складу пробіотиків. Присутність даних бактерій у ШКТ (шлунково-кишковому тракті) забезпечує антагоністичне середовище, яке направлене проти патогенних мікроорганізмів, створює умови для росту і розвитку корисних бактерій. Молочнокислі пробіотики родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* здатні посилювати абсорбційні можливості харчових компонентів, переносимість лактози, стабілізувати функцію печінки за рахунок нормалізації роботи кишечника та зниження рівня аміаку в крові [15].

Однак в останні роки все частіше спостерігаються випадки, коли позитивний ефект пробіотиків, навіть у випадку тривалого застосування, носить тимчасовий характер, а іноді й повністю відсутній. Внаслідок цього розширюється спектр мікроорганізмів, що виявляють антагоністичні властивості та чинять сприятливий вплив на життєдіяльність організму. Значну увагу приділяють пропіоновокислим бактеріям (ПКБ), які входять до складу мікрофлори ШКТ різних організмів. Пропіоновокислі бактерії синтезують вітамін В₁₂ та біфідогенні фактори росту, володіють високими адгезивними властивостями. Окрім того, на відміну від інших пробіотичних організмів, проявляють антимуtagenну дію, здатні знижувати токсичну дію ряду хімічних сполук і УФ-променів, є каталазопозитивними. Важливим продуктом метаболізму ПКБ є пропіонова кислота, яка включається в процес глікогенезу і стимулює мікроциркуляцію в слизовій оболонці кишечника. Зважаючи на це, представники роду *Propionobacterium* є найбільш перспективними мікроорганізмами для створення, як пробіотиків, так і метабіотиків, на основі продуктів їх життєдіяльності [3].

Отже, метою роботи було дослідити можливість сумісного культивування пропіоновокислих та класичних молочнокислих бактерій шляхом створення асоціацій двох типів на уніфікованих комплексних середовищах з кукурудзяним та дріжджовим екстрактами.

Відповідно до мети поставлені наступні завдання:

- Проаналізувати показники оптичної густини в індивідуальних культурах, асоціаціях двох типів на основі лактобацил, біфідо- та пропіоновокислих бактерій за умови вирощування їх на елективних та комплексних уніфікованих середовищах;
- Оцінити вміст органічних кислот у культуральній рідині при монокультивуванні та сумісному культивуванні досліджуваних мікроорганізмів.
- Дослідити антагоністичні властивості досліджуваних *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Propionibacterium*, їх асоціацій щодо грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, а також мікроскопічних грибів.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика пробіотиків

Пробіотик – це функціональний харчовий інгредієнт у вигляді корисних для людини чи тварини мікроорганізмів (найчастіше представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та асоційованих з ними), що забезпечує при систематичному вживанні у їжу (у складі препаратів або харчових продуктів) сприятливий вплив на організм внаслідок нормалізації складу та/або підвищення біологічної активності нормальної мікрофлори кишечника [15].

Пробіотики, здатні змінювати склад та метаболічну активність кишкової мікробіоти. Актуальність завдання застосування пробіотиків підтверджує висока частота дисбіотичних порушень кишкового мікробіоценозу, що належать до однієї з найпоширеніших причин дезадаптації організму різного віку.

Дія пробіотиків здійснюється на трьох рівнях: у порожнині кишечника (конкурують з патогенною та умовно-патогенною мікробіотою); лише на рівні кишкового епітелію (підвищують ефекти захисного кишкового бар'єру); на рівні кишкового імунітету (проявляють імуномодуючу дію). При цьому спостерігаються наступні ефекти пробіотиків: участь у біохімічних механізмах травлення та конкуренція за харчові компоненти з патогенами; зміна локального рН та інших метаболічних характеристик внутрішнього середовища кишківника; продукція бактеріоцинів для пригнічення патогенів; нейтралізація супероксидних радикалів; стимуляція продукції епітеліального муцину; посилення бар'єрної функції кишківника; конкуренція із патогенами за адгезію; модифікація патогенних токсинів; стабілізація мікробної спільноти [1, 10].

Одночасно зростає кількість даних про те, що вплив бактерій-симбіонтів не обмежується лише кишечником, а може поширюватись і на інші органи. Бактерії здатні активувати білкові комплекси, що запускають запальні реакції при вторгненні патогенів у різні частини організму [6]. На сьогодні,

однозначний і точний спосіб дії пробіотиків залишається невідомим. Цілком імовірно, що позитивний ефект пробіотиків виявляється в реалізації кількох механізмів.

У зв'язку з високими профілактичними і терапевтичними властивостями пробіотичні препарати можуть застосовуватись у різних галузях медицини [19]. Комплекси пробіотичних бактеріальних препаратів рекомендовані до застосування: у комплексній терапії ендокринних порушень; при вікових порушеннях травлення, пов'язаних із змінами ферментних систем; для профілактики та лікування токсичних (в тому числі алкогольних) уражень печінки, кишечника, нервової системи; для лікування захворювань, пов'язаних шкідливими виробничими умовами та екологічними факторами (в тому числі радіації); у комплексному лікуванні ниркової патології та серцево-судинних захворювань; у лікуванні гіповітамінозів та диселементозів; у комплексній терапії імунодефіцитів для підвищення резистентності організму до респіраторних інфекцій; для профілактики та лікування атеросклерозу; для осіб, які перебувають в умовах важких фізичних та стресових навантажень – як засіб, що посилює захисні функції організму та прискорює відновлювальні процеси; пробіотична корекція порушень мікрофлори матері для профілактики можливих ускладнень у дитини та постнатальне пробіотичне лікування дітей, у тому числі захист недоношених дітей від смертельно небезпечних некротичного коліту та сепсису; для лікування кишкових інфекцій, наприклад, від небезпечної зневоднюючої ротавірусної діареї у дітей); для профілактики та терапії ракових захворювань ШКТ (новий напрямок) [7,40].

Надзвичайно велике значення має застосування пробіотиків у тваринництві, зокрема в аквакультурі. Промислове штучне вирощування гідробіонтів у замкнутих системах водопостачання високої щільності посадки часто провокує підвищення рівня органічного забруднення води, а також нестабільність концентрації розчиненого кисню і збільшення кількості умовно-патогенних бактерій в цілій гідроекосистемі. Ці фактори призводять

до розвитку стресу у тварин з подальшим зниженням їх імунітету і втрати стійкості до збудників різних захворювань [34]. Застосування протимікробних засобів для профілактики і лікування виявляється не завжди ефективним. Крім того, досить часто при застосуванні антибіотиків спостерігається дефіцит корисної мікрофлори, поступове формування резистентності збудника до препарату та зниження імунної відповіді. Негативний вплив даних чинників на продуктивність рибних господарств є очевидним [31, 38].

Існує думка, що визначальну роль відіграють не самі бактерії, а лише їхні метаболіти. Однак це не так, оскільки бактерії мають певні ендометаболіти, які секретуються у середовище і їх складно отримати окремо поза клітинами. Наприклад, вітамін B₁₂ є ендометаболітом і при прийомі пробіотиків поглинається з автолізованих клітин. Схожі тенденції характеризують і детоксикуючі й антимуtagenні властивості. У даному випадку не тільки метаболіти, а й самі клітини бактерій (молочнокислих, пропіоновокислих або біфідобактерій) виявляють високу дисмутагенну активність щодо мутагенів широкого спектру дії. Доведено, що живі клітини міцно пов'язують усі мутагени, на відміну від загиблих [8].

Варто також відзначити здатність клітин живих пробіотичних мікроорганізмів до біосорбції важких металів. Так, наприклад, біфідо- та пропіоновокислі бактерії ефективно пов'язують кадмій та свинець за їх наявності у харчових продуктах. Це ж стосується і дезактивації ціаноксинів та мікотоксинів, а також до здатності пропіоновокислих бактерій нейтралізувати лектини, які руйнують слизову оболонку ШКТ та викликають серйозні проблеми зі здоров'ям, включаючи аглютинацію еритроцитів та проліферацію клітин аденокарциноми товстої кишки. *P. freudenreichii* здатні видалити 60-70% конканаваліну А (concanavilin A) з епітеліальних клітин кишечника, заміщаючи їх собою.

У зв'язку із цим, у даний час, найбільш ефективними лікувально-профілактичними засобами є рідкі форми пробіотиків, що містять одночасно як пробіотики, так і метабіотики [13].

1.2. Характеристика пропіоновокислих бактерій та їх метаболітів

1.2.1. Морфологічні та біохімічні ознаки роду *Propionibacterium*

Propionibacterium – рід грампозитивних анаеробних факультативних нерухомих бактерій. Пропіоновокислі бактерії є неспороносними паличками розміром 0,5-0,8 або 1,0-1,5 мкм. Утворюють колонії жовтого, оранжевого або червоного кольору, ростуть як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Непатогенні, мешкають у рубці та кишечнику жуйних тварин, риб, у молочних продуктах (твердих сирах), є представниками резидентної мікрофлори кишечника людини.

Таксономічне положення пропіоновокислих бактерій наступне: відділ: *Actinobacteria*; клас: *Actinobacteria*; підклас: *Actinobacteriae*; порядок: *Actinomycetales*; підпорядок: *Propionibacterineae*; сімейство: *Propionibacteriaceae*; рід: *Propionibacterium*.

Класичні («молочні») пропіоновокислі бактерії мають унікальні імуномодуючі та антимуtagenні властивості, вони приживаються в кишечнику людей і здатні до зниження генотоксичної дії низки хімічних сполук та УФ-променів. Відомо, що позитивна роль пропіоновокислих бактерій як пробіотиків зумовлена утворенням пропіонової кислоти, міnorних органічних кислот, бактеріоцинів і ферментів, а також синтезом великої кількості вітаміну B₁₂ [4].

Propionibacterium shermanii – вид грампозитивних факультативних анаеробних нерухомих бактерій розміром 0,5-0,6 або 1,5-2,0 мкм (в молодих культурах – викривлені, злегка розгалужені палички, в зрілих – коковидної форми). Розташовані парами або короткими ланцюжками.

На твердому живильному середовищі з кукурудзяним екстрактом колонії рожевого кольору круглі, маслянисті, пастоподібні з рівним краєм діаметром 3-5 мм. На синтетичному середовищі з агар-агаром колонії жовтувато-рожеві, круглі, маслянисті, пастоподібні з рівним краєм, діаметром 1-3 мм.

Propionibacterium freudenreichii – це традиційна молочна бактерія та продуцент коротколанцюгових жирних кислот (пропіонова та оцтова кислоти), а також вітаміну В₁₂. Клітини – плеоморфні (здатні набувати різної форми) палички (0,2-1,5 мкм, 1-5 мкм), але вони також можуть бути кокоїдними, роздвоєними, розгалуженими або ниткоподібними.

При вирощуванні на твердих середовищах утворені колонії можуть здаватися гладкими, опуклими або шорсткими. При вирощуванні в рідких середовищах формуються зернисті, варіабельні за розміром «колонії». Колонії можуть досить сильно відрізнятися за кольором: їх спостерігали як червоні, рожеві, оранжеві, жовті, сірі та білі.

Найбільш швидкий розвиток ПКБ спостерігається за температури від 30°C до 37°C і рН 7,0.

Пропіоновокислі бактерії за типом живлення є хемоорганотрофами. Головне енергетичне значення для пропіоновокислих бактерій мають ключові реакції пропіоновокислого бродіння, під яким мають на увазі біохімічний процес перетворення бактеріями цукру, молочної кислоти та її солей на пропіонову кислоту. У цьому бродінні, крім пропіонової кислоти, утворюються такі продукти, як оцтова кислота, вуглекислий газ, бурштинова кислота, ацетоїн, діацетил, інші леткі ароматичні сполуки – диметилсульфід, ацетальдегід, пропіоновий альдегід, етанол і пропанол.

Унікальність пропіоновокислого бродіння обумовлена участю карбоксилтрансфосфорилази, ферменту, не виявленого в інших організмів, що синтезують пропіонат. Завдяки наявності цього ферменту, бродіння, яке здійснюється пропіоновокислими бактеріями, працює як циклічний процес. Інша особливість бродіння пов'язана зі способом утворення пропіонату, яке

пов'язане з відновленням фумарату до сукцинату та окисненням пірувату до ацетату та CO_2 . Транспорт електронів, що супроводжує ці реакції, пов'язаний з окисним фосфорилуванням та синтезом АТФ. І третьою унікальною характеристикою бродіння є високий вихід АТФ, що перевищує вихід АТФ інших відомих бродіннях. 1,5 М глюкози можуть дати пропіоновокислих бактерій близько 6 М АТФ [30].

Пропіонобактерії синтезують аміак, фермент каталазу і ферменти дегідрогенази і цитохроми [33].

Цікавою особливістю ПКБ є утворення ними у великій кількості такого полімеру як глікоген, властивого клітинам тваринного організму. Накопичення та гідроліз глікогену у клітинах прокаріотів – рідкісне явище.

На відміну від інших бактерій, які використовують тільки АТФ, штами *P. freudenreichii* акумулюють також неорганічні поліфосфати як енергетичний резерв. Поліфосфати утворюються з пірофосфату та АТФ під дією поліфосфаткінази, що каталізує перенесення термінальної фосфатної групи від АТФ на пірофосфат або поліфосфат. Пірофосфат є одним із продуктів пропіоновокислого бродіння. Поліфосфати як енергетичний резерв дозволяє ПКБ тривалий час виживати в умовах субстратного голодування, наприклад, у стаціонарній фазі росту, здійснюючи основний (підтримуючий) обмін [30].

Трегалоза – специфічний нередукувальний дисахарид, який є запасним джерелом вуглецю та енергії, а також осмопротектором та антистресовим фактором клітин ПКБ. У клітинах *P. freudenreichii* синтез трегалози здійснюється двома альтернативними шляхами: з глюкози та пірувату або з мальтози. Синтез та акумуляція трегалози посилюються в стаціонарній фазі та при окисному, кислотному та осмотичному стресах.

Поліфосфати, глікоген і трегалоза сприяють, з одного боку, виживанню клітин ПКБ в умовах агресивного середовища ШКТ, забезпечуючи стійкість до природних інгібіторів, а з іншого, надходять у кишечник в результаті автолізу цих клітин [16].

Представники різних видів класичних пропіоновокислих бактерій виділяють у середовище білки, зокрема реактивуючі фактори, здатні підвищувати або відновлювати життєздатність клітин, що піддаються стресорному впливу (ультрафіолет, етанол, іони важких металів, прогрівання). Передбачається, що механізм реактивації клітин пов'язаний з індукцією у них синтезу антистресорних білків, особливо шаперонів, після взаємодії реактивуючих факторів зі спеціальними рецепторами цитоплазматичної мембрани. Головна функція шаперонів полягає у відновленні правильної нативної третинної або четвертинної структури білка, а також утворенні та дисоціації білкових комплексів. Багато видів шаперонів є білками теплового шоку, тобто білками, експресія яких починається у відповідь на вплив несприятливих чинників (збільшення температури, тиску тощо) [17].

1.2.2. Пробіотичні та антимікробні властивості пропіоновокислих бактерій

Шлунково-кишковий тракт тварин є складною екосистемою, де фізико-хімічне середовище несприятливе для екзогенних мікроорганізмів. Пробіотичний мікроорганізм повинен бути здатним виживати у кишечнику господаря та виробляти корисні метаболіти. Таким чином, стійкість до несприятливих умов ШКТ є одним з основних факторів, що обмежують використання мікроорганізмів як живих пробіотичних агентів. Шлункова кислота та жовчні солі є захисними механізмами, що зустрічаються під час кишкового транзиту, та й травні ферменти підшлункової залози також забезпечують антимікробну активність.

Пропіоновокислі бактерії є особливо витривалими в порівнянні з іншими пробіотиками, що відповідає їх екології. Вони демонструють високу толерантність *in vitro* до відділів шлунково-кишкового тракту, залежно від виду та типу штаму. При дії кислих та жовчних солей *P. freudenreichii* експресує загальні стресові білки та індукує регуляторні гени,

що беруть участь у клітинній відповіді на окисний стрес та пошкодження ДНК. Ці результати було підтверджено дослідженнями *in vivo*. *P. freudenreichii* орієнтує експресію свого геному на використання доступних через кишечник субстратів, таких як пропандіол, глюконат і лактат, для підтримки свого метаболізму, що дозволяє уникнути голодування під час травного транзиту [26].

Крім здатності витримувати літичні стреси, пробіотичні мікроорганізми повинні зберігатися в травному тракті, щоб взаємодіяти з клітинами-господарями та створювати очікувані позитивні ефекти. Тривалість життя пробіотиків у травному тракті залежатиме від здатності до адгезії слизової оболонки кишечника та швидкості їх росту. Пропіонібактерії характеризуються повільним ростом, так що адгезія та адаптація є вузьким місцем їхнього сприятливого впливу на організм господаря.

Численні дослідження показали здатність *P. acidipropionici* та *P. freudenreichii* прикріплюватись до ентероцитів кишечника людини та тварин. Тим не менш, рівень адгезії, оцінений *in vitro*, варіювався від 0,03 до близько 40%, залежно від багатьох факторів, таких як модель адгезії (клітини або слиз), вид, тип штаму і середовище-носіїв. Адгезія *P. freudenreichii* була виявлена навіть після теплової інактивації і здатна призводити до «виключення» патогенних інвазивних бактерій (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*) за допомогою механізмів конкурентної адгезії або спільної агрегації.

Механізми адгезії ПКБ залишаються погано вивченими, але деякі попередні експерименти вказують на визначальну роль поверхневих білків та тейхоевої кислоти. Нещодавно дослідження поверхневого протеому у *P. freudenreichii* показало наявність двох консервативних білків, які забезпечують адгезію інших видів бактерій. Першим білком є Internalin A, який має повторювані домени, багаті на лейцин (LRR), які, як відомо, залучені у взаємодію білок/білок. Другим – є білок ВорА, що належить до родини ABC (тобто ATP-binding cassette), що демонструє гомологію з білком адгезії

біфідобактерій [Помилка! Джерело посилання не знайдено.]. Однак і інші компоненти, що секретуються, можуть бути важливими в адгезії. Справді, було показано, що *P. freudenreichii* секретує ліпопептид, що має властивості біосурфактанту і має антиадгезивну дію на *P. aeruginosa*.

Всі ці дослідження свідчать про здатність «молочних» пропіонібактерій ефективно прилипати до слизової оболонки кишечника, а значна кількість різноманітних метаболітів забезпечуватиме їх резистентність щодо природних інгібіторів чи контакт пробіотика та клітин-мішеней.

Слід звернути увагу й на стійкість ПКБ щодо пеніциліну, хлортетрацикліну, хлорміцетину, стрептоміцину, еритроміцину, граміцидину С і поліміксину, тому можливе спільне застосування зазначених антибіотиків та пропіонових бактерій при лікуванні деяких захворювань як людей, так і тварин [2].

Важливою особливістю ПКБ, як і *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, є здатність утворювати бактеріоцини [5]. Відомо, що бактеріоцини – це синтезовані рибосомами пептиди або білки антимікробної дії. Згідно з літературними даними, до 99% бактерій мають здатність біосинтезувати принаймні один бактеріоцин. Активність, стабільність і спосіб дії бактеріоцинів визначаються їх амінокислотним складом і молекулярною структурою. Біосинтез бактеріоцинів залежить від різних факторів: рН, температури, складу та консистенції культурального середовища. Відповідний рН для виробництва бактеріоцинів пропіоновокислими бактеріями залежить від використовуваного штаму.

Більшість бактеріоцинів, синтезованих класичними ПКБ, відносять до низькомолекулярних білків, молекулярна маса яких не перевищує 10 000 Да, за винятком пропіоніцину SM1, маса якого становить 20 000 Да. Бактеріоцини характеризуються високою стабільністю в широкому діапазоні рН і температур – активні в кислому, нейтральному і лужному середовищі, є термостабільними (не втрачають активності після кількох або 15-хвилинного нагрівання при 100°C) [25, 27].

Найменшим з відомих сьогодні бактеріоцинів, синтезованих *Propionibacterium*, є пропіоніцин F. Його молекулярна маса становить 4397 Да, а зріла форма складається з 47 амінокислот. Це перший бактеріоцин, виділений з культури двох різних штамів виду *P. freudenreichii*: LMGT 2956 та LMGT 2946 [14].

Пропіоніцин SM1 є найбільшим з відомих в даний час пропіоніцинів, що продукуються двома різними штамми *P. jensenii*. Він утворений у вигляді 207-амінокислотного пропептиду. SM1 секретується поза клітиною. В результаті часткового протеолізу втрачається сигнальний фрагмент з 27 амінокислот на N-кінці.

Пропіоніцин T1 є позитивно зарядженим бактеріоцином із молекулярною масою 7,1 кДа. Він демонструє активність проти наступних бактерій: *P. acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoenii* та *P. acnes* та деяких штамів молочнокислих бактерій.

На підставі ідентифікації гена, що кодує пропіоніцин T1 (*pctA*), було встановлено, що пропіоніцин T1 синтезується у вигляді пропептиду з 96 амінокислот, що містить лідерний пептид довжиною 31 амінокислот на його N-кінці, що характеризується типовими ознаками сигнального пептида, гідрофобністю та специфічною ділянкою гідролізу. В результаті транслокації та процесингу другорядною системою, пропептид перетворюється на активний, 65-амінокислотний бактеріоцин. Бактеріоцин з повністю гомологічною послідовністю, аналогічною послідовності пропіоніцину T1, являє собою тієніцин 447, що продукується *P. thoenii* 447. Його зріла форма складається з 65 амінокислот.

P. freudenreichii знижують на 39% адгезію *S. aureus* до кишкового слизу та на 27% його життєздатність, ймовірно, за рахунок продукції органічних кислот. *P. freudenreichii* секретує ліпопептидний біосурфактант з антимікробною активністю, головним чином, проти *Rhodococcus erythropolis*, та антиадгезивною активністю, головним чином, проти *Pseudomonas aeruginosa*.

P. freudenreichii DSM 20270 значно пригнічує ріст *E. coli* O157: H7 (ентерогеморагічний штам кишкової палички, є частою причиною харчових отруєнь, в тому числі летальних) *in vitro* [9].

Синтезовані ПКБ ацетат і пропіонат проявляють виражений антимікробний ефект щодо патогенних мікроорганізмів і створюють сприятливе рН середовища. Співвідношення кількості пропіонової кислоти до оцтової, зазвичай, складає 2:1, але може змінюватися в широких межах і може досягати 5:1.

Пропіонова кислота ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$) – це коротколанцюгова жирна кислота, яка синтезується ПКБ. Вона транспортується в печінку і включається в процес глюконеогенезу та синтезу біогенних амінів, покращує мікроциркуляцію в слизовій оболонці кишечника і підтримує в ній метаболічні процеси, блокує прикріплення до колоноцитів умовно-патогенної мікрофлори. Пропіонова кислота бере участь у синтезі гормонів, нейромедіаторів (серотоніну, ендорфінів).

Дана кислота проявляє антибактеріальну та протигрибкову активність (у харчовому виробництві запобігає мікробіологічному псуванню продуктів), перешкоджає колонізації кишечника патогенними мікроорганізмами, наприклад, шигелами, сальмонелами, водночас забезпечує розвиток анаеробних бактерій нормальної мікрофлори ШКТ.

Отже, пропіоновокислі бактерії та їх метаболіти є важливим фактором підтримки балансу мікробної екосистеми макроорганізму. Унікальні корисні властивості ПКБ та повна відсутність у них токсичності дозволило рекомендувати їх як лікувально-профілактичні препарати для захисту та відновлення мікрофлори (в тому числі для зниження генотоксичного впливу на організм) під час та після проведення антибактеріальної терапії (а також променевої, гормональної та хіміотерапії).

1.3. Властивості молочнокислих бактерій як біологічних агентів

1.3.1. Особливості організації та життєдіяльності представників родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*

У природі молочнокислі мікроорганізми представлені кулястими і паличкоподібними бактеріями. За останньою класифікацією, наведеною у Визначнику Bergey (Берджі), молочнокислі бактерії (МБК) віднесені до двох окремих родин – *Streptococcaceae* та *Lactobacillaceae*.

Усі молочнокислі бактерії, незалежно від класифікації, мають спільні властивості – грампозитивні (Гр+), неспороутворюючі, нерухомі, не викликають видимого розпаду білків, факультативні анаероби [28, 29].

На сьогоднішній день найбільш вивченими є різні штами лактобацил. Відомо, що рід *Lactobacillus* включає приблизно 90 видів із широким спектром біохімічних та фізіологічних властивостей [23].

Молочнокислі палички представлені трьома підродами: *Thermobacterium* (термобактерії), *Streptobacterium* (стрептобактерії) і *Betabacterium* (бетабактерії). До першої групи в підрід *Thermobacterium* віднесені облігатні гомоферментативні лактобактерії. До підроду *Streptobacterium* увійшла друга група, що об'єднує факультативні гетероферментативні лактобактерії, а третя група молочнокислих паличок представлена облігатними гетероферментативними лактобактеріями, віднесеними до підроду *Betabacterium*.

Багато видів лактобактерій є представниками аутохтонної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, починаючи від ротової порожнини і закінчуючи товстою кишкою. Лактобактерії зазвичай мають правильну форму довгої «палички», іноді кокоподібні, розміром 0,5-1,2 x 1,0-10,0 мкм. Розташовуються короткими ланцюжками або поодинокі.

Лактобактерії за типом живленн є ауксотрофами, у зв'язку з чим є надзвичайно вимогливими до типів живильних середовищ. Вони адаптувалися до комплексних органічних субстратів. Крім того, їм потрібні для розвитку не

тільки вуглеводні джерела, а й нуклеотиди, амінокислоти і вітаміни. Найчастіше для росту необхідний рибофлавін. Виявляється потреба у фолієвій та амінобензойній кислотах, неоднаковій для різних видів. Біотину і вітаміну B_{12} потребують тільки декілька видів [20].

Лактобактерії володіють ефективним метаболізмом ферментації вуглеводів і амінокислот, який пов'язаний з субстратним фосфорилуванням. Другим рівнем фосфориляції є перетворення карбамідфосфата в CO_2 і NH_3 . Заключним етапом фосфорилювання є ферментація аргініну, що спостерігається у більшості гетероферментативних лактобактерій [37].

Види Біфідобактерій (*Bifidobacteria spp.*) належать до роду *Bifidobacterium*, із сімейства *Bifidobacteriaceae*, порядку *Bifidobacteriales*, що належить до типу *Actinobacteria*. Біфідобактерії утворюють домінуючу фракцію шлунково-кишкової мікробіоти людини, особливо у немовлят. Біфідобактерії присутні у кількості від 10^8 до 10^{10} клітин на 1 г кишкового вмісту.

Всі представники роду *Bifidobacterium* – грампозитивні, нерухомі, неспорогенні, не утворюють в процесі життєдіяльності газу, анаеробні (проте, деякі види можуть бути аеротолерантними), каталазо-негативні (крім *Bifidobacterium indicum* і *Bifidobacterium asteroides*), цукролітичні.

Всі вони за типом живлення є хемоорганотрофами, що активно зброджують вуглеводи з утворенням переважно оцтової та молочної кислот у молярному співвідношенні 3:2, CO_2 не утворюють. Деякі види можуть зростати в атмосфері, збагаченій до 10% CO_2 . Їхнє зростання припиняється при рН нижче 4.5 або вище 8.5. Як правило, при фарбуванні препарату біфідобактерій за Грамом, для них характерна біполярність. Однак і це правило не без винятку, оскільки деякі штами біфідобактерій при фарбуванні набувають вигляду клітин, що містять гранули, що не відповідає характерній для біфідобактерій біполярності. Іноді вони схожі на ланцюжок коків [24].

Форму клітин бактерій із роду *Bifidobacterium*, зазвичай, описують як плеоморфну. Плейоморфізм змінюється в залежності від виду. Деякі види

представлені великою різноманітністю клітинних форм, тоді як інші показують гомогенну морфологію клітин. Їх розмір становить $0.5-1,3 \times 1.5-8$ мкм². Вони можуть розташовуватися поодинокі, парами, утворювати фігури V-подібної форми. Залежно від умов культивування, клітини біфідобактерій демонструють значний плеоморфізм (стан, за якого індивід приймає низку різних форм під час свого життєвого циклу). Було показано, що надлишок у середовищі для культивування N-ацетилглюкозаміну, аланіну, глютамінової кислоти, серину та іонів кальцію впливає на форму клітин біфідобактерій.

На щільних живильних середовищах біфідобактерії утворюють різноманітні за формою та кольором колонії: плоскі, напівкулясті, блискучі, шорсткі, оточені валиком, що мають більш темний центр, від білого і сірого до темно-коричневого. Розміри колоній становлять від 0.5 до 5.0 мм. Серед штамів, що виділені із кишечника дорослих людей, переважно зустрічаються паличкоподібні та булавоподібні форми, у той час як палички, що розгалужуються, частіше зустрічаються у дітей грудного віку. На ранніх стадіях розвитку у біфідобактерій переважають паличкоподібні форми, а при подальшому культивуванні утворюються розгалужені нитки з численними перегородками в основному стовбурі та відгалуженнях.

Всі описані на даний момент види біфідобактерій розподілені за такими основними екологічними нішами: кишечник людини, порожнина рота, вагінальна порожнина, шлунково-кишковий тракт тварин, кишечник комах, кисломолочні продукти та стічні води. Однак дві останні еконіші є вторинними для біфідобактерій [39].

Біфідобактерії не утворюють індол і сірководень, не здатні до відновлення нітратів та розрідження желатину. Вони не продукують фенол, не утворюють аміак з аргініну.

Біфідобактерії зброджують цукор з утворенням молочної кислоти як основний кінцевий продукт. Однак сумарне рівняння має особливий характер і не відповідає ні гомоферментативному, ні типовому гетероферментативному

молочнокислому бродінню. Цей вид бродіння має єдиний у своєму роді біохімічний механізм перетворення глюкози [32].

Ці мікроорганізми здатні руйнувати канцерогенні речовини, що утворюються деякими представниками кишкової мікрофлори при азотному обміні, виконуючи, таким чином, роль «другої печінки» [35].

1.3.2. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії відіграють важливу роль у забезпеченні захисної функції кишкової мікрофлори. Лактобацили здатні пригнічувати патогенні та умовно патогенні мікроорганізми за рахунок виділення органічних кислот, в першу чергу молочної та оцтової, що призводить до зниження рН середовища кишечника до 3,8-4,0 [22].

Молочнокислі бактерії своєю присутністю у всьому ШКТ створюють антагоністичне середовище, яке виявляє несприятливий вплив на патогенні грамнегативні та газоутворюючі анаеробні бактерії. При цьому блокуються молекули клітинної адгезії хвороботворних мікроорганізмів та утворюються умови для росту та розвитку корисних бактерій типу *E. coli*.

Для підвищення антагоністичної активності використовують різні мутагенні фактори – ультрафіолетове випромінювання, хімічні агенти: етиловий ефір, уретан, етиленіміни. Під дією цих факторів підсилюється стійкість молочнокислих бактерій [39].

Важливими факторами пригнічення росту патогенних мікроорганізмів є ряд високо- і низькомолекулярних метаболітів, які в поєднанні з органічними кислотами часто виявляють синергічну дію і можуть суттєво підвищити мікробіологічні показники якості цільового продукту.

Молочна й оцтова кислоти є основними ендометаболітами МКБ, що утворюються під час молочнокислого бродіння. Оцтова кислота, порівняно з молочною, має ширший спектр антимікробної активності. Відомо, що між цими кислотами існує синергічний ефект, тобто у суміші вони інтенсивніше

пригнічують розвиток чутливих бактерій, ніж у разі індивідуального впливу [36].

У присутності кисню, деякі види МКБ можуть утворювати невелику кількість гідроген пероксиду, який є субстратом для НАДН-оксидазного і супероксиддисмутазного комплексу ферментів. Ефект пероксиду може бути посилений за наявності лактопероксидази і тіоціанату, які є в природному середовищі існування МКБ – у молоці. Антимікробний ефект пероксиду водню пов'язаний із сильною окислювальною дією. Доведено, що пригнічення грамнегативних бактерій роду *Pseudomonas*, які часто контамінують харчові продукти, відбувається внаслідок дії пероксиду водню, накопиченого під час розвитку бактерій родів *Lactococcus* і *Lactobacillus* [18].

Велике значення має лізоцим – фермент класу гідролаз, який здатний розщеплювати пептидоглікановий шар бактеріальної клітинної стінки з подальшим вивільненням мурамової, глютамінової та аспаргінової кислот, глюкозаміну, лізину, що призводить до загибелі клітини [12].

Водночас, попри ряд переваг, на жаль, молочнокислі бактерії не володіють високою стійкістю до значної кількості антибіотиків.

Підсумовуючи усе вищезазначене, можна констатувати, що:

- більшість пробіотичних препаратів створено на основі лакто- та біфідобактерій, оскільки ці мікроорганізми є компонентами нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту і відіграють важливу фізіологічну роль у функціонуванні мікроекосистеми організму. Однак, попри ряд переваг даних бактерій існує низка недоліків, що є аргументом для пошуків чи удосконалення інших пробіотичних мікроорганізмів, зокрема пропіоновокислих бактерій;

- використання пробіотиків можна визнати одним із найактуальніших питань біотехнології XXI століття та найбільш перспективних напрямів у функціональному харчуванні для корекції дисбіозів ШКТ, а також для зниження ризику розвитку найбільш поширених аліментарно-залежних захворювань. Однак ця мета може бути досягнута лише за умови отримання

надійних доказів щодо оцінки ефективності конкретних пробіотичних продуктів, що базується на адекватній та стандартизованій методології, починаючи зі штамів пробіотичних мікроорганізмів;

- важливість вибору правильного потенційного пробіотика, адаптованого для різних наземних і водних організмів та середовищ, з розумінням механізмів його дії, є очевидною. Відсутність єдиної концепції щодо дії пробіотиків є суттєвим аргументом для їх подальшого всебічного дослідження: у науковій літературі періодично з'являються нові відомості стосовно шляхів впливу та результатів діяльності пробіотичних організмів.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом для дослідження слугували чисті музейні культури мікроорганізмів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, люб'язно надані нам співробітниками Ужгородського національного університету, а також культура *Propionibacterium*, виділена нами із закваски для виготовлення твердого сиру Емменталь.

Об'єкт досліджень – сумісне культивування молочнокислих та пропіоновокислих бактерій, оцінка морфо-фізіологічних та біохімічних властивостей асоціацій двох типів.

2.1. Індивідуальне вирощування пробіотичних культур на елективних середовищах

Ліофілізовані культури мікроорганізмів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* відновлювали у рідких елективних поживних середовищах впродовж 24 год за температури 37 °C. З отриманого посівного матеріалу готували забарвлені препарати для ідентифікації досліджуваних мікроорганізмів.

Для *Lactobacillus* готували елективне поживне середовище MRS наступного складу (г/л): декстроза – 20,0, дикалію фосфат – 2,0, ферментативний перевар казеїну – 10,0, тріамонія цитрат - 2,0, м'ясний екстракт – 10,0, Твін 80 - 1,08, натрій ацетат – 5,0, магнію сульфат гептагідрат – 0,20, дріжджовий екстракт – 4,0, марганцю сульфат тетрагідрат – 0,05, бактеріологічний агар – 10,0.

Для *Bifidobacterium* використовували елективне середовище Блаурокка, що містило (г/л): пептон ферментативний – 23, агар мікробіологічний – 0,75, натрій хлорид – 5, дріжджовий екстракт – 5,25, глюкоза – 7,5, лактоза – 2,5, натрій ацетат – 0,5, аскорбінова кислота – 0,5, магній хлорид – 0,5, цистеїн

гідрохлорид – 0,5. Готували в розрахунку 25 г готового середовища на 500 мл дистильованої води.

Готові поживні середовища автоклаували впродовж 30 хв, охолоджували до температури 45-50°C.

У стерильні колби об'ємом 250 мл вносили 45 мл рідкого елективного поживного середовища та 5 мл (10%) відповідного інокуляту.

В усіх випадках кількість бактерій в інокуляті стандартизували, оцінюючи оптичну густину бактеріальної суспензії у культуральній рідині при довжині хвилі 540 нм на фотоколориметрі КФК-2 (10^8 КУО/мл).

Таким чином, загальний об'єм культурального середовища становив 50 мл, у ньому вміст посівного матеріалу складав 10%.

Процес основної ферментації тривав 24 год за температури 37 °C.

2.2. Створення модифікованого поживного середовища для

Propionibacterium

На основі даних про склад різних елективних середовищ для вирощування *Propionibacterium* було створене модифіковане поживне середовище наступного складу (г/л): хлористий магній – 0,6, лимоннокислий натрій – 2, фосфорнокислий калій – 0,1, аскорбінова кислота – 0,02, хлористий кобальт – 0,01, глюкоза – 4, пептон – 0,2, агар поживний сухий – 4, дистильованою водою доводили до 250 мл у колбі.

Культуру *Propionibacterium* виділяли із закваски для виготовлення сиру Емменталь торгової марки «Заквасочка» (країна виробник: Італія).

Проводили оцінку фізіолого-морфологічних, культуральних і тинкторіальних ознак досліджуваних мікроорганізмів за допомогою мікроскопіювання тимчасово забарвлених препаратів та препаратів, забарвлених за Грамом.

Для подальшого культивування використовували це саме середовище – для отримання посівного матеріалу бактерії вирощували 24 год за температури

37 °C. Для основної ферментації у стерильну колбу вносили 5 мл (10%) інокуляту та 45 мл поживного середовища. Процес культивування тривав 48 год за аналогічного температурного режиму.

2.3. Створення модифікованих уніфікованих поживних середовищ для досліджуваних культур мікроорганізмів

Проаналізувавши інформацію про різноманітні елективні поживні середовища для лактобацил, біфідо- та пропіоновокислих бактерій були створені два модифіковані уніфіковані середовища, які містять всі необхідні складові для забезпечення нормального росту та розвитку досліджуваних мікроорганізмів, а саме: пептон – 10 г/л, ацетат натрію – 15 г/л, сульфат магнію – 0,56 г/л, сульфат марганцю – 0,12 г/л, калій фосфорнокислий – 2 г/л, глюкоза – 15 г/л, цистеїн – 0,5 г/л, аскорбінова кислота – 0,2 г/л.

Одне поживне середовище містило у своєму складі **кукурудзяний** екстракт, інше – **дріжджовий**. Їх вміст в обох випадках була однаковою.

Приготування кукурудзяного екстракту здійснювали у кілька етапів:

- подрібнення крупи до часточок, розміром 1 мм;
- замішування помелу з питною водою температурою 40 °C;
- стерилізація отриманої маси впродовж 30 хв;
- оцукрювання розвареної маси на водяній бані за температури 60 °C впродовж 40 хв;
- фільтрування затору та випарювання сусла;
- охолодження продукту та зберігання в холодильнику.

Приготування дріжджового екстракту в свою чергу складалось з таких етапів:

- розведення 40 г пресованих хлібопекарських дріжджів торгової марки «Львівські дріжджі» у дистильованій воді у співвідношенні 1:1 та розмішування до повного розчинення,

- доведення дистильованою водою отриманої маси до об'єму 100 мл у колбі;
- проведення стерилізації впродовж 40 хв;
- фільтрування отриманого продукту кілька разів;
- стерилізація впродовж 30 хв;
- охолодження та зберігання в холодильнику.

2.4. Індивідуальне вирощування культур на двох типах уніфікованих поживних середовищ

Усі три досліджувані культури мікроорганізмів вирощували на двох типах модифікованих уніфікованих середовищ. Культивування здійснювали у колбах Ерленмейєра об'ємом 250 мл, загальний робочий об'єм складав 50 мл, вміст інокуляту – 10%. Основна ферментація тривала 48 год за температури 37 °C.

Показники оптичної густини культури оцінювали за допомогою фотоелектроколориметра, вимірюючи оптичну густину культуральної рідини за довжини хвилі 540 нм. Контролем слугувало стерильне поживне середовище.

Вміст органічних кислот визначали титриметричним методом. Кількісне визначення молочної кислоти проводили таким чином: у хімічну склянку наливали 10 мл досліджуваного матеріалу та відтитровували його 0,1 н розчином NaOH, який готували у розрахунку 0,4 г кристалічного NaOH на 100 мл дистильованої води. Додавали кілька крапель водного розчину фенолфталеїну та проводили титрування до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хвилини. Обчислення відсоткового вмісту лактату виконували, враховуючи, що 1 мл 0,1 н NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти (молекулярна маса молочної кислоти дорівнює 90, 1 дм³ 0,1N розчину NaOH розчину містить 9 г, а 1 см³ - 0,009 г молочної кислоти).

Кількісне визначення ацетату, в свою чергу, проводили так: 10 мл культуральної рідини вносили у хімічну склянку та за наявності кількох крапель фенолфталеїну відтитровували 1 н розчином NaOH (готували у розрахунку 4 г кристалічного NaOH на 100 мл дистильованої води). За різницею кількості мілілітрів NaOH, що пішов на титрування наприкінці досліду і на початку досліду визначали кількість утвореної в середовищі оцтової кислоти з урахуванням того, що 1 мл 1 н NaOH відповідає 0, 06 г ацетату.

2.5. Створення асоціацій двох типів на основі лактобацил, біфідо- та пропіоновокислих бактерій

Асоціації мікроорганізмів це – полікомпонентні бактеріальні структури, створені на основі кількох монокультур з метою посилення їх корисних властивостей.

В **асоціаціях** співвідношення між індивідуальними культурами становило 1:1:1.

Для створення **асоціації першого типу** використовували посівний матеріал мікроорганізмів, вирощених на уніфікованому **комплексному** середовищі. Надалі у стерильні колби Ерленмейєра об'ємом 250 мл вносили інокулят 5% культури *Propionibacterium*, 5 % *Bifidobacterium* та 5% *Lactobacillus*. Додали створене нами основне комплексне середовище та, відповідно, кукурудзяний/дріжджовий екстракт. Процес основної ферментації тривав 24 год при 37 °С.

Для створення **асоціацій другого типу** спочатку кожен індивідуальну культуру вирощували на відповідному **елективному** середовищі: лактобацили на рідкому поживному середовищі MRS, біфідобактерії на рідкому середовищі Блаурокка та пропіоновокислі бактерії – на модифікованому елективному середовищі. Культивування тривало 24 год при 37 °С. Надалі добові культури використовувались для створення асоціацій.

Основна ферментація, що тривала 24 год при 37 °С, здійснювалася аналогічно до першого варіанту.

Для перевірки життєдіяльності досліджуваних мікроорганізмів створені асоціації висівали на елективні, для кожної культури, агаризовані поживні середовища та інкубували одну добу за температури 37 °С. Надалі – підраховували та описували утворені колонії. Крім того, проводили вимірювання оптичної густини та визначали кількість органічних кислот – лактату та ацетату.

2.6. Дослідження антагонізму

Пробіотичні мікроорганізми характеризуються високими антагоністичними властивостями щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Для оцінки антагоністичних властивостей монокультур *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* та їх асоціацій використали метод відстроченого антагонізму. Тест-культурами слугували: грампозитивні *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, грамнегативні бактерії виду *Pseudomonas syringae* та мікроскопічні гриби – *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*.

На поверхню твердого середовища загального типу МПА у чашці Петрі по діаметру наносили досліджуваний пробіотичний штам. Проводили культивування впродовж доби за 37°С, після чого перпендикулярно до досліджуваного штаму, який виріс, підсівали референс-культури. Культивування здійснювали впродовж 48 год при 37°С.

Результати експериментальних даних опрацьовували статистично з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. При цьому вірогідними були результати при рівні достовірності $p \leq 0,05$ за критерієм Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка показників густини досліджуваних культур за різних умов культивування

На першому етапі експериментальних досліджень оцінювали характеристики пробіотичних культур за умов монокультивування в елективних та уніфікованих поживних середовищах.

Експериментальні дані показали наступне (рис. 3.1.1):

- Показники густини значною мірою залежать як від компонентного складу поживного середовища, так і від вирощуваної культури.
- При вирощуванні *Lactobacillus* зафіксували активний розвиток на стандартному для них середовищі. Водночас, не зареєстровано достовірної різниці у непрямих показниках нагромадження біомаси лактобацил на обох комплексних уніфікованих середовищах.
- Представники роду *Bifidobacterium* продемонстрували активний ріст на середовищі Блаурокка, в той час як на комплексних середовищах кількість утвореної біомаси була достовірно нижчою. При цьому поживне середовище з дріжджовим екстрактом виявилось більш ефективним, порівняно з тим, яке містило в своєму складі кукурудзяний екстракт.
- Загальна біомаса пропіоновокислих бактерій на елективному середовищі була незначною. Зростання біомаси майже у 3 рази вдалось досягти при застосуванні комплексних середовищ. Варто зазначити, що поживне середовище з дріжджовим екстрактом виявилось найбільш ефективним для *Propionibacterium*. При формуванні складу елективного середовища для пропіоновокислих бактерій ми орієнтувалися на те, що дані бактерії є прототрофами і не вибагливими щодо факторів росту. Очевидно, внесених солей органічних та неорганічних кислот, виявилось недостатньо для оптимального розвитку культури, а наявні сполуки в екстрактах стимулювали розвиток пропіонібактерій.

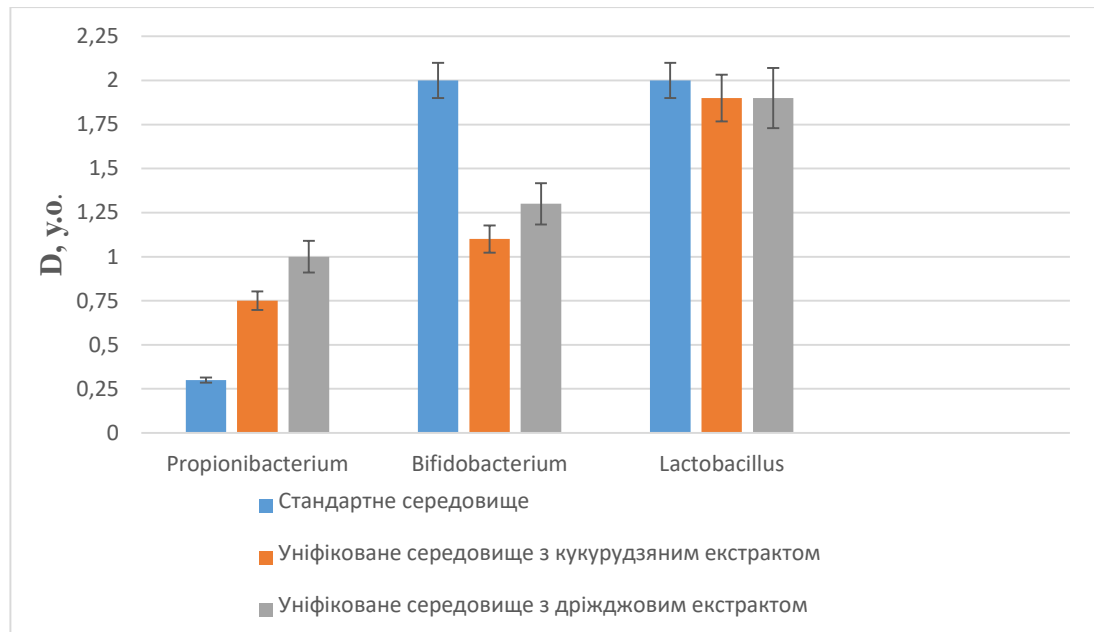


Рис. 3.1.1. Показники оптичної густини монокультур *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* у рідких середовищах різного типу

Оцінку показників густини було проведено також для асоціацій (рис.3.1.2).

Нами не встановлено достовірних відмінностей в усіх 4 досліджуваних випадках. Проте, слід зазначити наступні тенденції:

- серед асоціацій найбільші показники густини продемонструвала асоціація другого типу, що зростала на комплексному поживному середовищі з дріжджовим екстрактом;
- дещо нижчими виявились показники, що опосередковано характеризували нагромадження біомаси, для асоціації першого типу (середовище з дріжджовим екстрактом) та асоціації другого типу (середовище з кукурудзяним екстрактом);
- найнижчий рівень показника зафіксували при оцінці асоціації другого типу, вирощеної на уніфікованому середовищі з кукурудзяним екстрактом.

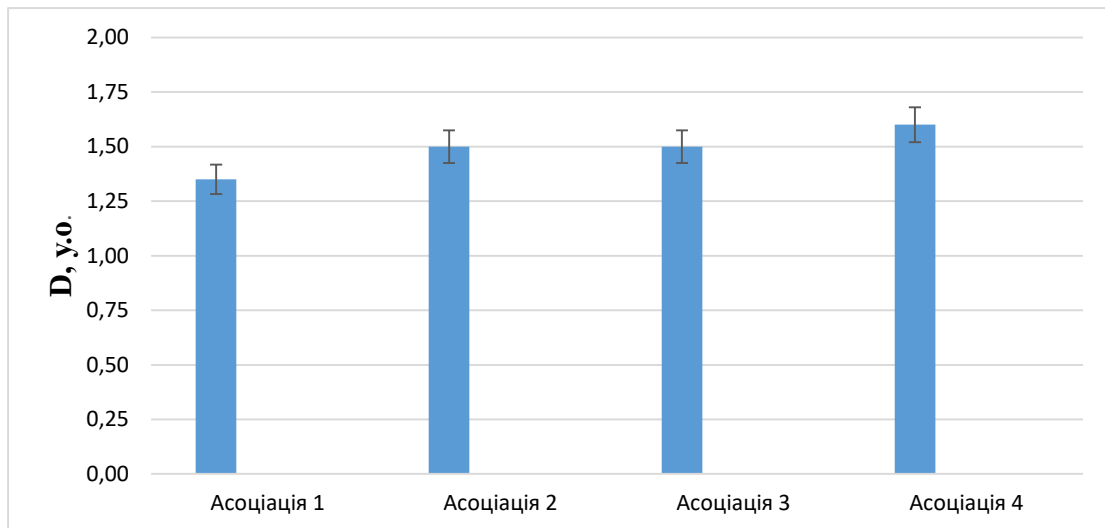


Рис. 3.1.2. Показники оптичної густини мікроорганізмів асоціацій після 24-годинної основної ферментації у модифікованих середовищах

Примітка (тут і надалі): 1 – асоціація мікроорганізмів першого типу у середовищі з кукурудзяним екстрактом (інокулят – комплексне середовище), 2 – асоціація другого типу у середовищі з кукурудзяним екстрактом (інокулят – елективне середовище), 3 – асоціація першого типу у середовищі з дріжджовим екстрактом (інокулят – комплексне середовище), 4 – асоціація другого типу у середовищі з дріжджовим екстрактом (інокулят – елективне середовище).

3.2. Аналіз вмісту органічних кислот у досліджуваних культурах

Результати експериментальних досліджень показали неоднозначні тенденції утворення коротколанцюгових жирних кислот при культивуванні бактерій у різних середовищах (рис. 3.2.1).

Пропіоновокислі бактерії в уніфікованих поживних середовищах активніше продукували молочну кислоту. При цьому у середовищі, що містило кукурудзяний екстракт утворювалося в 2,3 рази більше лактату, ніж у елективному. Уніфіковане середовище з дріжджовим екстрактом виявилось у 2,1 рази ефективнішим, ніж елективне.

Кількість лактату, утвореного біфідобактеріями, на уніфікованих середовищах, навпаки, виявилась меншою: у 2,4-2,7 рази нижчою на комплексних середовищах у порівнянні з елективним.

Лактобацили в результаті зброджування компонентів середовищ утворили однакову кількість лактату на елективному та комплексному середовищі з дріжджовим екстрактом. Кількість молочної кислоти, утвореної на середовищі з кукурудзяним екстрактом була дещо нижчою.

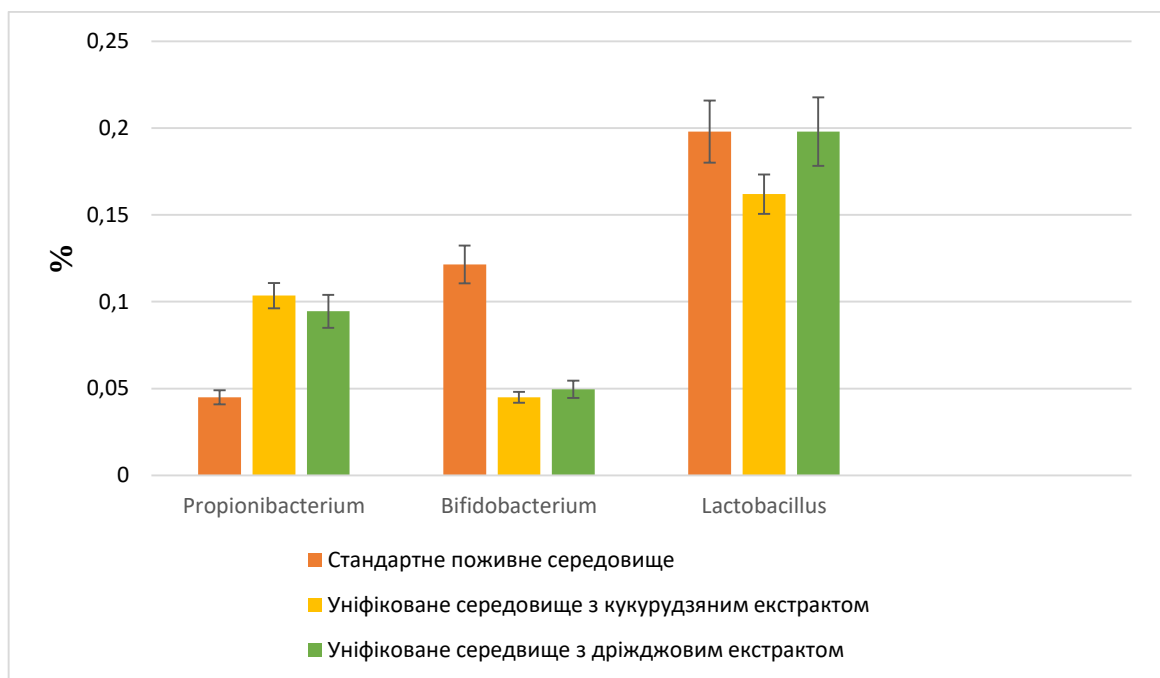


Рис. 3.2.1. Вміст лактату у середовищі культивування досліджуваних культур

Ацетат є метаболітом усіх корисних бактерій кишечника – підвищує поглинання кисню, кровообіг у слизовій оболонці, він, проходячи через печінку, знову надходить у кров, стає енергетичним субстратом для клітин тканин та органів: м'язової тканини, серця, нирок, головного мозку та інших.

Оцтова та молочна кислота регулюють рівень рН, моторну та секреторну активність кишечника, мають послаблюючий та антимікробний ефекти.

Експериментальні дані вказують, що *Propionibacterium* у 2,5 та у 5,75 разів більше утворювали ацетату на комплексних середовищах з кукурудзяним та дріжджовим екстрактами відповідно порівняно з елективним.

Кількість оцтової кислоти, утвореної біфідобактеріями на комплексних середовищах, була у 2-4 нижчою, ніж на елективному. Представники роду *Lactobacillus* продукували більше ацетату на комплексних середовищах у порівнянні з елективним.

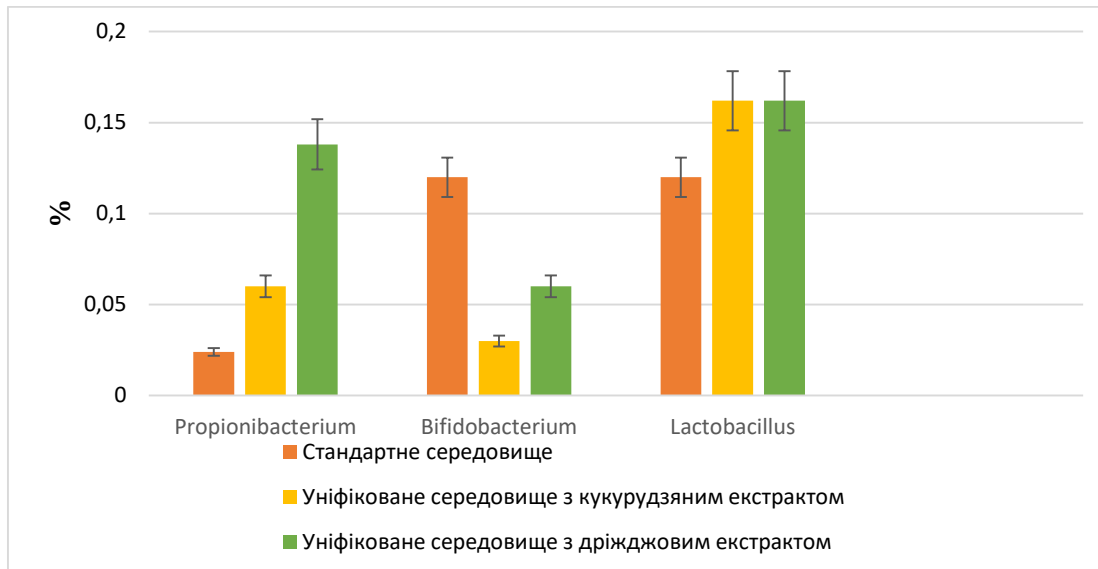
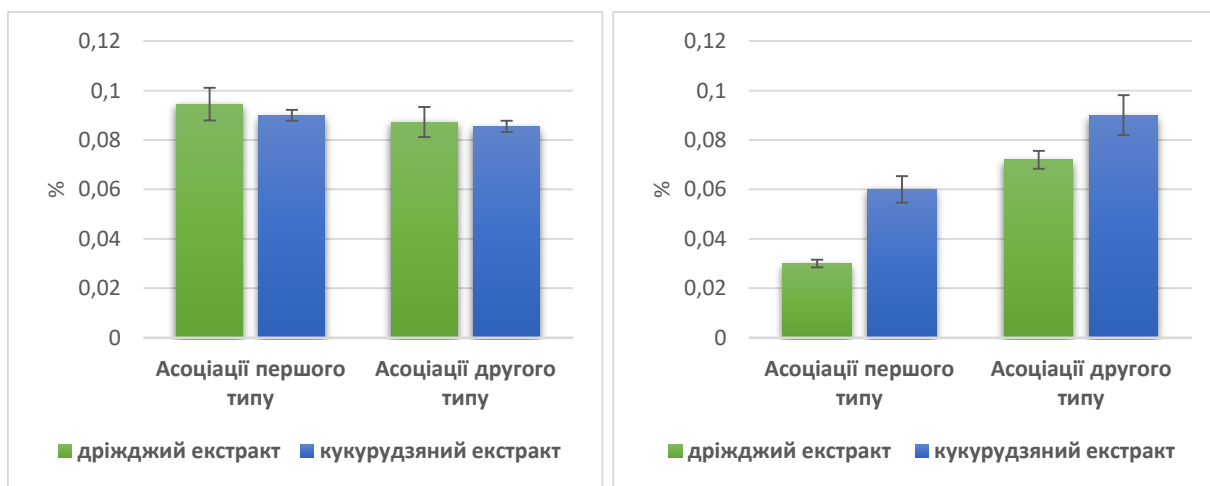


Рис. 3.2.2. Вміст ацетату у середовищі культивування досліджуваних культур

Дослідження вмісту молочної кислоти в асоціаціях двох типів не показало достовірних відмінностей (рис. 3.2.3 А).



А

Б

Рисунок 3.2.3. Вміст органічних кислот у середовищі культивування асоціацій досліджуваних культур

Примітка: А – лактат; Б - ацетат

Ефективнішим для продукції ацетату мікроорганізмами є комплексне уніфіковане середовище з кукурудзяним екстрактом, у ньому нагромаджувалося у 1,25-2 рази більше ацетату, порівняно із середовищем, що містило дріжджовий екстракт (рис. 3.2.3 Б).

Таким чином, наявність дріжджового екстракту у складі поживного середовища зумовила збільшення накопичення лактату, а кукурудзяного екстракту – збільшення продукування ацетату.

3.3. Оцінка виживаності мікроорганізмів при моно- та кокультивуванні

Культури лактобацил, біфідо- та пропіоновокислих бактерій, отриманих в результаті монокультивування у комплексному поживному середовищі, висівали на елективні агаризовані поживні середовища, культивували протягом 24 год при температурі 37°C з метою подальшої оцінки виживаності даних мікроорганізмів.

Характеристика отриманих колоній була наступною:

I. *Bifidobacterium*: форма – куляста, розмір – середні, колір – світло-жовтий, консистенція – пастоподібна, структура колоній – однорідна, рельєф поверхні – переважно плоский (рис.3.3.1, А).

II. *Lactobacillus*: форма – округла, з чіткими обрисами, розміри – дрібні, структура – переважно однорідна, колір колоній – білий, консистенція пастоподібна, рельєф поверхні – трохи випуклий (рис.3.3.1, Б).



Рис.3.3.1. Колонії *Bifidobacterium* (А) та *Lactobacillus* (Б) на елективних поживних середовищах

III. *Propionibacterium*: форма – переважно округла, деякі колонії питкоподібної форми, розмір – дрібні, колір – білий, структура – однорідна, консистенція – пастоподібна, рельєф поверхні плоский.

Оцінку виживаності проводили і для мікроорганізмів асоціацій. Результати показали, що виживаність лактобацил та біфідобактерій на модифікованих комплексних середовищах знижувалась, порівняно з монокультурами. Кількість живих клітин пропіоновокислих бактерій на комплексних щільних середовищах виявилась, навпаки, більшою, ніж на елективному.

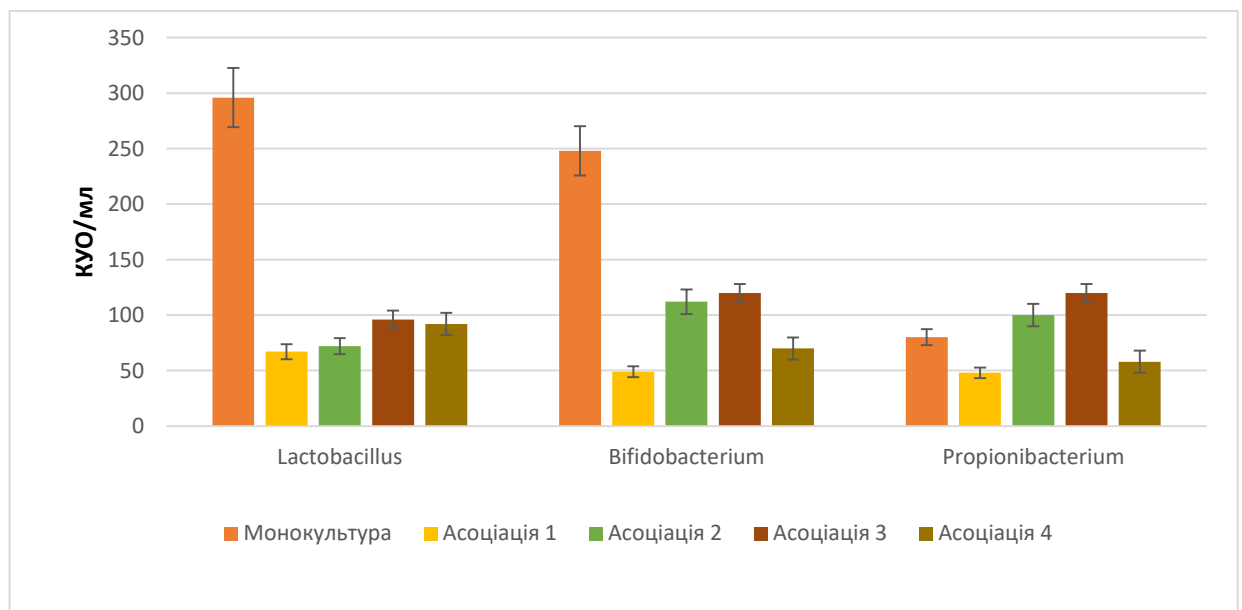


Рис. 3.3.2. Кількість КУО/мл пробіотичних бактерій на елективних поживних середовищах за умов моно-та кокультивування

3.4. Дослідження антагонізму індивідуальних культур та асоціацій

Відомі літературні дані про спільне культивування *Propionibacterium freudenreichii* та біфідобактерій *Bifidobacterium longum*, що виявляється у різкому посиленні антагоністичного ефекту щодо таких тест-мікроорганізмів, як *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas sp.* та *Staphylococcus aureus* за рахунок збільшеного накопичення в живильному середовищі органічних кислот [Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

Як свідчать наші експериментальні дослідження, асоціаціям пробіотичних бактерій притаманний більш значний антагоністичний ефект, ніж монокультурам (рис. 3.4.1. - 3.4.4.)

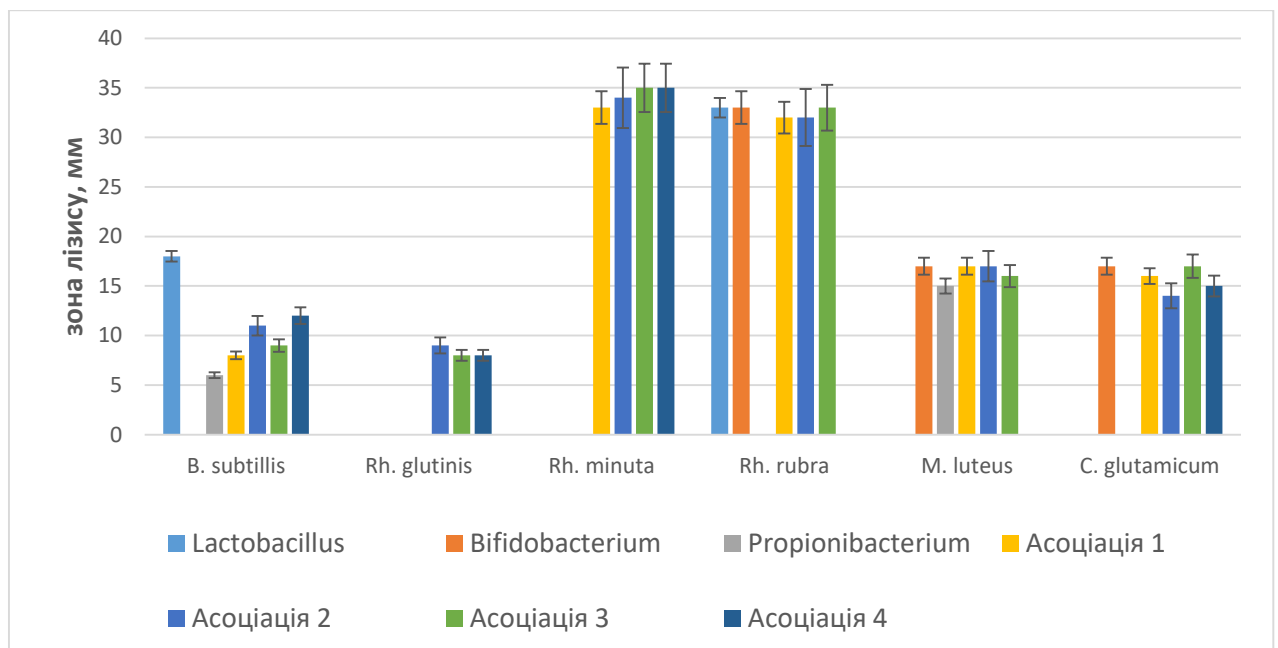


Рис. 3.4.1. Антагоністичний вплив досліджуваних пробіотичних культур на тест-культури

Дослідження показало, що з індивідуальних культур активнішими антагоністами виявились молочнокислі бактерії. Лактобацили та біфідобактерії повністю інгібували ріст *R. rubra*, *C. glutamicum*, *M. luteus*, у той

час як представники роду *Propionibacterium* продемонстрували гальмівний вплив на розвиток *M. luteus* та *B. subtilis*.



Рис. 3.4.2. Антагоністичний вплив окремих пробіотичних бактерій на розвиток тест-культур

Примітка: 1 – *Micrococcus luteus*, 2 – *Enterococcus faecalis*, 3 – *Saccharomyces cerevisiae*, 4 – *Pseudomonas syringae*, 5 – *Bacillus subtilis*, 6 – *Rhodotorula glutinis*, 7 – *Rhodotorula minuta*, 8 – *Rhodotorula rubra*, 9 – *Corynebacterium glutamicum*

Обидві асоціації першого типу проявляли активний антагонізм щодо *M. luteus*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *C. glutamicum*, *B. subtilis*

Розвиток *R. glutinis* ефективніше інгібували асоціації другого типу бактерій, вирощеної у середовищі з дріжджовим екстрактом.

При дослідженні антагоністичного впливу асоціацій мікроорганізмів вирощених на уніфікованому середовищі спостерігали їх активний розвиток, порівняно з асоціаціями мікроорганізмів, посівний матеріал яких отримували на елективному середовищі.

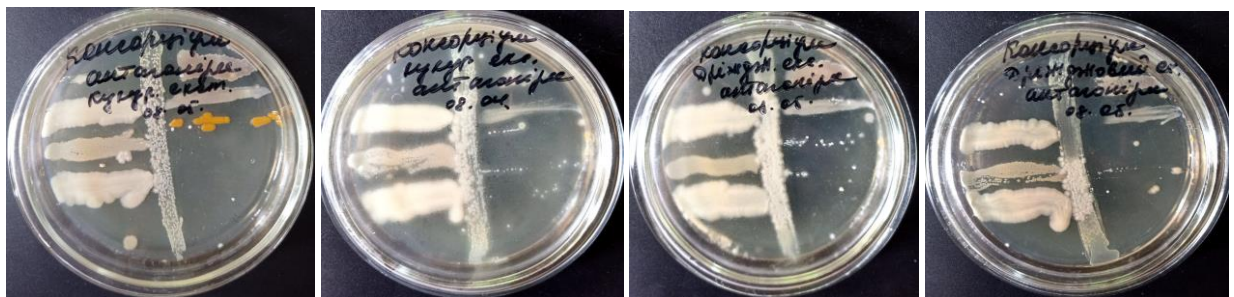


Рис. 3.4.3. Антагоністичний вплив асоціацій першого типу на розвиток тест-культур

Обидві асоціації другого типу проявляли інгібуючу дію проти *B. subtilis*, при цьому активнішою була асоціація з дріжджовим екстрактом. Аналогічні тенденції спостерігались і з тест-культурою *R. glutinis*. В свою чергу асоціація з кукурудзяним екстрактом виявилась більш ефективною проти *R. minuta*, *R. rubra*, *C. glutamicum*.

Майже однаковий антагоністичний ефект виявлено в обох асоціаціях проти *M. luteus*.



Рис. 3.4.3. Антагоністичний вплив асоціацій другого типу на розвиток тест-культур

Таким чином, асоціації двох типів проявили антагонізм проти 6 тест-культур: *B. subtilis*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *C. glutamicum*, *M. luteus*. Індиферентною виявилася їх дія щодо *Saccharomyces cerevisiae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas syringae*.

Отже, уніфіковані поживні середовища виявились ефективними для монокультур пропіоновокислих бактерій та лактобацил, а також асоціацій. Асоціації бактерій двох типів, вирощені на даних поживних середовищах виявили активний антагоністичний вплив на ряд тест-культур, а саме: *B. subtilis*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *C. glutamicum*, *M. luteus*.

Створення комплексних поживних середовищ є альтернативою готовим промисловим середовищам, які можуть бути не завжди доступними. Застосування кукурудзяного та дріжджового екстрактів є економічно доцільним, адже вартість однієї пачки пресованих дріжджів від 6 грн за 42 г. Цього достатньо для приготування 100 мл екстракту, який можна вводити до складу поживного середовища у невеликій кількості. Для кукурудзяного

екстракту можна використати кукурудзяну крупу, вартість якої в середньому стартує від 15 грн за 500 грам. Такі компоненти поживного середовища в свою чергу забезпечать мікроорганізми макро- та мікроелементами, протеїнами, вітамінами групи В та факторами росту.

ВИСНОВКИ:

1. Застосування модифікованих уніфікованих поживних середовищ, що містили кукурудзяний та дріжджовий екстракти виявились придатними для сумісного культивування досліджуваних пробіотичних мікроорганізмів, а також ефективними для росту пропіоновокислих бактерій та лактобацил.
2. Відзначено збільшення вмісту органічних кислот (лактату й ацетату) у випадку монокультивування *Propionibacterium* та *Lactobacillus* за умов використання уніфікованих комплексних поживних середовищ.
3. Індивідуальні культури *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* були активними антагоністами щодо *R. rubra*, *C. glutamicum*, *M. luteus*, *B. subtilis*. Асоціації обох типів показали високий інгібуючий вплив щодо 6 досліджуваних тест-культур: *B. subtilis*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. rubra*, *C. glutamicum*, *M. luteus*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Amara A. A., Shibl A. M. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Journal of the Saudi Pharmaceutical Society*. 2015. Vol. 23(2). P. 107–114.
2. Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, &Y., Feng, Q. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*. 2015. Vol. 17(5).
3. Chamlagain, B. Fermentation fortification of active vitamin B12 in food matrices using *Propionibacterium freudenreichii*: Analysis, production and stability. 2016.
4. Chamlagain, B., Deptula, P., Edelmann, M., et al. Effect of the lower ligand precursors on vitamin B12 production by food-grade *Propionibacteria*. *LWT-Food Sci Technol*. 2016. Vol. 72. P. 117-124.
5. Chiu, C. Y., Chan, Y. L., & Chiu, C. C. Gut microbial dysbiosis is associated with allergen-specific IgE responses in young children with airway allergies. *World Allergy Organization Journal*. 2019. Vol. 12(3).
6. De Kivit, S., Tobin, M. C., Forsyth, C. B., Keshavarzian, A., & Landay, A. L. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Frontiers in Immunology*. 2014. Vol. 5.
7. de Vos WM., Tilg H., Van Hul M., Cani PD. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*. 2022. Vol. 71(5).
8. Demirci, M., Tokman, H. B., & Kocazeybek, B. S. Reduced *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* levels in the gut microbiota of children with allergic asthma. *Allergologia et immunopathologia*. 2019. Vol. 47(4). P. 365-371.
9. Deutsch, S., Mariadassou, M., & Falentin, H. Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(1).

10. Doron S., Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015. Vol. 60.
11. Eş, I., Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., & Koubaa, M. Current advances in biological production of propionic acid. *Biotechnology letters*. 2017. Vol. 39. P. 635-645.
12. Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., & Liu, P. A review on gut remediation of selected environmental contaminants: possible roles of probiotics and gut microbiota. *Nutrients*. 2018. Vol. 11(1). P. 22.
13. Forssten, S., Evans, M., & Ouwehand, A. C. Influence of a probiotic mixture on antibiotic induced microbiota disturbances. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014. Vol. 20(33). P. 118.
14. Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., & Ohno, H. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*. 2011. Vol. 469(7331). P. 543–547.
15. Gibson, G. R., Hutkins, R. W., & Reid, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2017. Vol. 14(8). P. 491–502.
16. Gollwitzer, E. S., & Marsland, B. J. Impact of early-life exposures on immune maturation and susceptibility to disease. *Trends in immunology*. 2015. Vol. 36(11). P. 684-696.
17. Guan, N., Liu, L., & Chen, J. Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: Mechanism and application. *Journal of Biotechnology*. 2013. Vol. 167(1). P. 56-63
18. Halttunen, T., Collado, M. C., El-Nezami, H., Meriluoto, J., & Salminen, S. Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Letters in applied microbiology*. 2008. Vol. 46(2). P. 160-165.

- 19.Hoseinifar, S. H., Sun, Y., & Zhou, Z. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9.
- 20.Kutscha, R., Pflügl, S. Microbial Upgrading of Acetate into Value-Added Products—Examining Microbial Diversity, Bioenergetic Constraints and Metabolic Engineering Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21.
- 21.Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino acids*. 2009. Vol. 37. P. 43-53.
- 22.Li, X., Tu, S., Pan, B., Mu, W., & Zhang, T. Purification and Partial Characterization of *Lactobacillus* Species SK007 Lactate Dehydrogenase (LDH) Catalyzing Phenylpyruvic Acid (PPA) Conversion into Phenyllactic Acid (PLA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56(7). P. 2392–2399.
- 23.Luna GM., Quero GM., Kokou F., Kormas K. Time to integrate biotechnological approaches into fish gut microbiome research. *Curr Opin Biotechnol*. 2022. Vol. 73. P. 121-127.
- 24.Luo J., Li Y., Xie J., et al. The primary biological network of *Bifidobacterium* in the gut. *FEMS Microbiol Lett*. 2018. Vol. 365(8).
- 25.Mathur H., Rea MC., Cotter PD., Hill C., Ross RP. The sactibiotic subclass of bacteriocins: an update. *Curr Protein Pept Sci*. 2015. Vol. 16(6).
- 26.Meile, L., Le Blay, G., & Thierry, A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International journal of food microbiology*. 2008. Vol. 126(3). P. 316-320.
- 27.Mohamed SE., Tahoun MK. The expression of propionicin PLG-1 gene (plg-1) by lactic starters. *J Dairy Res*. 2015. Vol. 82(2).
- 28.Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 2017. Vol. 22(8).

29. Peters, A. L., Krumbholz, P., Jäger, & Stäubert, C. Metabolites of lactic acid bacteria present in fermented foods are highly potent agonists of human hydroxycarboxylic acid receptor 3. *PLOS Genetics*. 2019. Vol. 15(5).
30. Piwowarek, K., Lipińska, E., Hac-Szymanczuk, E., Kieliszek, M., & Ścibisz, I. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 102(2). P. 515–538.
31. Pohanka M. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. *Biomed Res Int*. 2020.
32. Sayes, C., Leyton, Y., & Riquelme, C. Probiotic Bacteria as an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. *In InTech eBooks*. 2018.
33. Soltani, M., Shenavar Masouleh, A., Ahmadi, M., & Taherimirghaed, A. Antibacterial activity, antibiotic susceptibility and probiotic use of lactic acid bacteria (LAB) in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal*. 2016. Vol. 2(1). P. 54-65.
34. Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., & Negi, R. K. Fish gut microbiome: current approaches and future perspectives. *Indian journal of microbiology*. 2018. Vol. 58. P. 397-414.
35. Turner JW Jr., Cheng X., Saferin N., Yeo JY. Gut microbiota of wild fish as reporters of compromised aquatic environments sleuthed through machine learning. *Physiol Genomics*. 2022. Vol. 54(5). P. 177-185.
36. Vandenplas, Y., Huys, G., & Daube, G. Probióticos: informações atualizadas. *Jornal de pediatria*. 2015. Vol. 91. P. 6-21.
37. Wieërs, G., Belkhir, L., & Cani, P. D. How probiotics affect the microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020. Vol. 9. P. 454.
38. Wuertz, S., Schroeder, A., & Wanka, K. M. Probiotics in Fish Nutrition—Long-Standing Household Remedy or Native Nutraceuticals? *Water*. 2021. Vol. 13(10). P. 1348.

39. Yamada, C., Gotoh, A., & Fushinobu, S. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell chemical biology*. 2017. Vol. 24(4). P. 515-524.
40. Yang, Y., Xia, Y., Chen, H., Hong, L., & Ma, Y. The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a randomized controlled trial. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7(7). P. 843.

ДОДАТКИ

Додаток А**Правила охорони праці****Вимоги безпеки перед початком роботи**

1. Лабораторія має знаходитись у прибраному та чистому стані; на робочих місцях мають знаходитись лише необхідні прилади та матеріали, запаси зберігаються у шафах або на складі.

2. Перед початком роботи потрібно:

- оглянути та упорядкувати робоче місце;
- перевірити витяжну систему;
- перевірити правильність підключення устаткування до електромережі;
- перевірити справність струмопровідних дротів і відсутність оголених ділянок;
- переконатися в наявності захисного заземлення приладів.

3. Забороняється приступати до роботи при виявленні пошкодження обладнання.

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Під час роботи у лабораторії слід дотримуватись таких правил:

1. Необхідно використовувати захисний одяг (лабораторний бавовняний халат, при необхідності гумові рукавички та окуляри; при роботі з дрібно дисперсними речовинами потрібно носити респіраторні маски);

2. Двері під час роботи мають бути зачинені;

3. При роботі з вибуховими та легко займистими речовинами потрібно дотримуватись запобіжних заходів. Зберігати вибухові та горючі речовини необхідно в окремих приміщеннях у невеликих кількостях і в місцях, захищених від світла, вологи і пилу;

4. При роботі з летючими речовинами слід користуватись витяжною шафою.

У приміщеннях кафедри забороняється:

- працювати без нагляду співробітника або лаборанта;

- працювати у верхньому одязі;
- користуватися косметикою, палити, їсти, пити та зберігати продукти харчування;
- викидати в раковини скло, сміття, виливати концентровані кислоти, луги, органічні розчинники, легкозаймисті та горючі рідини;
- користуватись електронагрівачами, джерелами відкритого вогню (сірниками, запальничками тощо);
- переносити обладнання без дозволу зав. кафедри або зав. лабораторією;
- користуватись зіпсованими електроприладами;
- самостійно проводити ремонт розеток, вимикачів, запобіжників;
- користуватись витяжними шафами з розбитим склом або непрацюючою вентиляцією;
- зберігати реактиви у посуді без етикеток.

По закінченні роботи слід мити руки.

Робота з хімічними речовинами

Робота з хімічними речовинами має бути орієнтована на такі принципи:

1. Робота з шкідливими речовинами повинна відповідати вимогам техніки безпеки та захисту довкілля.
2. Використання токсичних та потенційно канцерогенних речовин необхідно зводити до мінімуму. При можливості такі речовини замінюються на менш токсичні.
3. У лабораторії можна зберігати лише ті речовини, які необхідні для роботи найближчим часом.
4. У кожній лабораторії повинні бути списки небезпечних речовин.

Вимоги безпеки після закінчення роботи.

По закінченні роботи кожний працівник зобов'язаний:

- привести до порядку робоче місце, прилади та апаратуру;
- виходячи останнім, зачинити вікна (квартирки), вимкнути світло, газ, перевірити чи вимкненні всі електроприлади та закриті крани, зачинити

приміщення на ключ. Ключі передаються черговому охоронцю, про що робиться запис у журналі.

Вимоги безпеки в аварійних ситуаціях

До аварійних ситуацій відносяться:

- розгерметизація технологічних трубопроводів, тари та обладнання з викидом продукту, його пари та пилу у виробниче та зовнішнє середовище;
- загоряння технологічних трубопроводів, обладнання, продукту;
- відключення електропостачання, яке живить засоби колективного захисту, обривання і коротке замикання електрокомунікацій, електрообладнання.

У разі розливу легкозаймистих та горючих рідин необхідно погасити газові пальники, вимкнути електроживлення загальним рубильником, розлитий продукт засипати піском, пісок зібрати і усунути у безпечне місце.

У випадку займання легкозаймистих та горючих рідин необхідно:

- негайно приступити до її гасіння, застосовуючи відповідні для даного випадку засоби гасіння (пісок, порошкові та інші вогнегасники);
- негайно вимкнути вентиляцію, пальники і нагрівальні прилади;
- винести з приміщення посудини з вогнєнебезпечними речовинами.

При виникненні іскріння (спалахування) струмоведучих частин електрообладнання, лаборант зобов'язаний його негайно знеструмити, повідомити про це електрику, завідувачому лабораторією.

У разі виявлення пожежі (ознак горіння) необхідно:

- припинити роботу; - знеструмити електрообладнання;
- негайно повідомити про це телефоном пожежну охорону. При цьому необхідно назвати адресу об'єкта, вказати кількість поверхів будівлі, місце виникнення пожежі, обстановку на пожежі, наявність людей, а також повідомити своє прізвище;
- вжити (за можливістю) заходів до евакуації людей, гасіння (локалізації) пожежі та збереження матеріальних цінностей;
- повідомити про пожежу наукового керівника або працівників кафедри;

- у разі необхідності викликати інші аварійно-рятувальні служби (медичну, газорятувальну тощо);
- у випадку оголошення евакуації швидко й організовано покинути приміщення лабораторії та навчального корпусу.

Надання першої медичної допомоги

У випадку *ураження людини струмом* перш за все потрібно вимкнути рубильники та викликати «Швидку допомогу» за номером 103.

При легких *термічних опіках* шкіру слід промити етанолом, а потім змастити гліцерином або вазеліном. При більш сильних опіках обпечене місце після промивання концентрованим розчином перманганату калію та етанолом необхідно змастити засобом від опіків.

При *опіках кислотами* потрібно промити обпалене місце великою кількістю води протягом 10 хвилин, потім – 3% розчином соди.

При *опіках лугами* шкіру потрібно промити великою кількістю води, а потім нейтралізувати 1% розчином борної кислоти. Аміак майже не діє на шкіру, але при попаданні в очі може викликати сильне пошкодження і навіть сліпоту.

При *отруєнні хімікатами* слід терміново викликати лікаря або відправити потерпілого в найближчий лікувальний заклад.

При *попаданні хімікатів у очі* їх необхідно негайно промити великою кількістю води.

При *порізах* у разі необхідності видалити з рани уламки скла або інших матеріалів, промити рану, краї рани продезинфікувати 3% спиртовим розчином йоду, а потім накласти стерильну пов'язку. При сильних кровотечах слід накласти вище рани джгут і викликати лікаря або направити того, хто постраждав, у лікарню.

Публікації за результатами досліджень