

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан

²Республиканский клинический госпиталь инвалидов ВОВ, г. Алматы, Казахстан

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

Аннотация

Установлена зависимость адгезивной активности исследуемых штаммов молочнокислых бактерий от состава питательной среды. Оптимальной питательной средой для молочнокислых бактерий, обеспечивающей высокую адгезивную способность, является MRS, для бифидобактерий - гидролизатно-молочная, для пропионовокислых бактерий - комбинированная. Отмечены межштаммовые различия в степени адгезии бактерий. Выявлена зависимость адгезивной активности бактерий от протекторов, вносимых в препарат. Повышению адгезии у бактерий способствуют пищевые волокна, желатозо-сахарозная среда, бентонит.

Ключевые слова: молочнокислые, пропионовокислые, бифидобактерии, ассоциации, адгезия.

Современным представлением механизма положительного действия пробиотиков является их многогранность, ассоциированная с подавлением патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет продукции биологически активных веществ, конкуренцией за лимитируемые нутриенты и сайты адгезии на кишечной стенке; влиянием на ферментативную активность желудочно-кишечного тракта и стимуляцией иммунной системы организма хозяина [1, 2, 3, 4].

Наиболее важным свойством пробиотических бактерий является обеспечение колонизационной резистентности, т.е. способности защиты кишечной стенки от проникновения во внутреннюю среду организма как бактерий, так и токсинов и токсических продуктов различного происхождения [1, 5, 6].

В комплексе механизмов колонизационной резистентности важную роль играет антагонистическая активность пробиотической культуры, ее способность колонизировать слизистую, которая складывается из адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника. Конкуренции последних за рецепторы связывания и блокады адгезии и колонизации слизистых патогенными и условно-патогенными микробами с участием факторов как иммуноглобулиновой природы, так и неспецифических факторов защиты организма хозяина. Роль адгезинов у разных микроорганизмов выполняют поверхностно расположенные фимбрии, антигены белковой или полисахаридной природы, липотейхоевые кислоты, фосфолипиды и др. [2, 7].

Обладая высоким сродством к рецепторам энтероцитов и адгезируя с ними, представители нормальной кишечной микрофлоры тем самым уменьшают потенциал патогенного воздействия на стенку кишечника со стороны болезнетворных микроорганизмов.

Таким образом, одним из основных свойств пробиотических микроорганизмов является адгезивная активность.

Цель исследований – изучение адгезивной активности пробиотических бактерий различных групп в зависимости от различных факторов.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*-2в, 2в/А-6, 22-8/13, 14д и 14д/А-24, *L. Curvatus* 18д, *L. acidophilus* 27w и 4, *L. Brevis* В-3 и В-3/А-26, *L. casei* 173а и 139₁, *L. Cellobiosus* 2/7, 28, 37н и 7н₁, *L. Fermentum* 27, 27/Ап-3, 127

и 127/A-4, *L. salivarius* 8д и 39н, бифидобактерий *Bifidobacterium longum* 7w, 5, 6, 10 и *B.bifidus* 3 и 9. а также пропионовокислых бактерий *P. shermanii* 15, 8, 5 и 2/10.

Для культивирования молочнокислых бактерий использовали питательные среды: комбинированную на основе кукурузного экстракта, MRS и сусло – агар, для бифидобактерий - гидролизатно-молочную и MRS полужидкую с цистеином, для пропионовокислых бактерий - комбинированную и MRS с кобальтом.

Определение адгезивной активности проводили по методу С.С. Гизатулиной [8] на эритроцитах человека. Активность оценивали в степенях: 1 степень - отрицательная адгезия, 2 – отсутствие адгезии, 3 – средняя адгезия, 4 – высокая адгезия.

Для определения адгезивной активности также использовали метод подсчета числа бактерий, прикрепившихся на эритроцитах [9]. Учет результатов проводили по среднему показателю адгезии (СПА). При СПА от 0 до 1,0 микроорганизм считали неадгезивным, от 1,01 до 2,00 - низкоадгезивным, от 2,01 до 4,00 - среднеадгезивным и от 4,01 и более - высокоадгезивным.

Результаты и обсуждение

Исследование зависимости адгезивной активности молочнокислых бактерий от состава питательной среды показало, что при росте на комбинированной питательной среде и сусло-агаре у большинства культур отсутствовала адгезивная способность. Высокой адгезивной активностью при росте на сусло-агаре, а также на комбинированной среде обладают культуры *L. fermentum* 127/ А-4, *L. brevis* Б-3/А-26, *L. casei* 139 (таблица 1).

При росте на среде MRS все исследованные штаммы, отобранные для включения в состав пробиотиков, обладают адгезивной способностью. Штаммы *L. Cellobiosus* 28 и 37н, *L. casei* 173а, *L. plantarum* 22-8/13 имеют высокую степень адгезии (4 степень). Остальные штаммы проявили на этой среде среднюю адгезию (3 степень).

Таблица 1 - Степень адгезии молочнокислых бактерий на различных питательных средах

Штаммы молочнокислых бактерий	Степень адгезии на различных питательных средах		
	комбинированная	MRS	сусло-агар
<i>L. plantarum</i> -2в/А-6	3	3	3
<i>L. plantarum</i> -22	2	3	2
<i>L. plantarum</i> -22-8/13	3	4	3
<i>L. plantarum</i> -14д	2	3	2
<i>L. plantarum</i> -14д/А-24	2	3	2
<i>L. curvatus</i> 18д,	3	3	3
<i>L. acidophilus</i> 27w	2	3	2
<i>L. brevis</i> В-3	3	3	3
<i>L. brevis</i> В-3/А-26	4	3	4
<i>L. casei</i> 173а	3	4	3
<i>L. casei</i> 139 ₁	4	3	4
<i>L. cellobiosus</i> 2/7	2	3	2
<i>L. cellobiosus</i> 28	3	4	3
<i>L. cellobiosus</i> 37н	3	4	3
<i>L. cellobiosus</i> 7н ₁	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 27	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 27/Ап-3	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 127	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 127/А-4	4	3	4
<i>L. salivarius</i> 8д	2	3	2
<i>L. salivarius</i> 39н	2	3	2

Выявлена зависимость адгезивной активности отдельных культур от наличия в питательной среде ионов кальция. Так, культура *L.fermentum* 127/ А-4 при росте на комбинированной среде без мела имеет вторую степень адгезии, а с мелом - четвертую.

Ассоциация из *L. brevis* Б-3 и *P. shermanii*-15 на комбинированной среде без мела имела 20% клеток второй степени адгезии и 80% - третьей степени, на среде с мелом число бактериальных клеток с адгезивной активностью третьей степени увеличилось до 90%.

В процессе исследований наблюдались межштаммовые различия в степени адгезии бактерий. Так, штаммы 139 и 173а, относящиеся к одному и тому же виду *L. casei*, отличались по способности к адгезии. Штамм *L. casei* 139 обладал адгезивной активностью третьей степени при росте на комбинированной среде, в то время как у штамма 173а адгезивная активность отсутствовала. Аналогичные результаты получены и с другими видами бактерий.

В результате исследований установлена зависимость адгезивной активности бифидобактерий от питательной среды, используемой для их выращивания. Слабая адгезивная активность отмечена у *B. longum* 5, 6, 10 и *B. bifidus* 9 при выращивании их на питательной среде MRS полужидкой. При выращивании на гидролизатно-молочной питательной среде все исследованные штаммы бифидобактерий имели адгезивную активность третьей степени (таблица 2).

Таблица 2 - Степень адгезии бифидобактерий на различных питательных средах

Штаммы пропионовокислых бактерий	Степень адгезии на различных питательных средах		
	гидролизатно-молочная без мела	гидролизатно-молочная с мелом	MRS с цистеином
<i>B. longum</i> 5	3	3	2
<i>B. longum</i> 6	3	3	3
<i>B. longum</i> 10	3	3	2
<i>B. longum</i> 7w	3	3	3
<i>B. bifidus</i> 9	3	3	2

В процессе исследований отмечены также межштаммовые различия в степени адгезии этих бактерий. Наибольшей адгезивной способностью обладает штамм *B. longum* 7w.

Для пропионовокислых бактерий также установлена зависимость адгезивной активности от состава питательной среды, используемой для их выращивания (таблица 3).

Отмечено отсутствие адгезивной активности у *P. shermanii* штамм 15 и штамм 5 при выращивании их на питательной среде, рекомендованной для пропионовокислых бактерий (содержит кукурузный экстракт, глюкозу, аммоний серноокислый и кобальт хлористый).

При выращивании на комбинированной питательной среде все исследованные штаммы пропионовокислых бактерий имели адгезивную активность третьей степени.

Таблица 3 - Степень адгезии пропионовокислых бактерий на различных питательных средах

Штаммы пропионовокислых бактерий	Степень адгезии на различных питательных средах		
	комбинированная	MRS с кобальтом	среда для ПКБ
<i>P. shermanii</i> 15	3	3	2
<i>P. shermanii</i> 8	3	3	3
<i>P. shermanii</i> 5	3	3	2
<i>P. shermanii</i> 2/10.	3	4	3

На среде MRS с кобальтом штамм *P. shermanii*-2/10 имел четвертую степень адгезии, в то время как остальные третью.

Не выявлено зависимости адгезивной активности у исследованных штаммов пропионовокислых бактерий от присутствия в питательной среде ионов кальция. Это свидетельствует о наличии у данных культур одного типа адгезинов.

В процессе исследований отмечены межштаммовые различия в степени адгезии пропионовокислых бактерий. Наибольшей адгезивной способностью обладает штамм *P. shermanii*-2/10.

Исследована зависимость адгезивной активности бактерий от протекторов, вносимых в препарат (пищевые волокна, пектин, желатозо-сахарозная среда, бентонит). Повышение адгезии до 4 степени у штаммов *Bifidobacterium* отмечено в присутствии пищевых волокон и бентонита за счет агрегации бактериальных клеток.

Результаты исследований по изучению зависимости адгезивной активности молочнокислых бактерий от протекторов, вносимых в препарат, представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Влияние протекторов на адгезивную активность молочнокислых и пропионовокислых бактерий

Штаммы бактерий	Титр бактерий, КОЕ/мл	Степень адгезии бактерий в зависимости от вносимых протекторов в жидкую культуру			
		исходный	с желатозо-сахарозной средой	с пектином	с пищевыми волокнами
7н ₁	4,5x10 ⁸	3	3 -	3 -	3
27Ап-3	6,2x10 ⁸	3	3 -	4	3
22-8/13	7,4x10 ⁸	3	3	3+	3+
14д	6,1x10 ⁸	3	3	3+	3+
39н ₁	3,7x10 ⁸	3	3	3	3
ПКБ-5	5,3x10 ⁸	3	3	3	3
ПКБ-8	6,2x10 ⁸	3	3	3	3
ПКБ-15	7,0x10 ⁸	3	3+	3	3+
ПКБ 2/10	9,5x10 ⁸	3	3+	3	3+
14д А-24	3,9x10 ⁸	3	2	3	3
28 исходный	1,5x10 ⁹	3	3	3	4
22 А-310	6,7x10 ⁸	3	3	3	3
27w	3,1x10 ⁸	3	3	3	3
2в А-6	1,5x10 ⁹	3	4	3	3
Б-3	2,5x10 ⁸	3	4	4	3
А-5	1,9x10 ⁹	3	3	3	3
Б-3 А-26	2,3x10 ⁹	3	3	3	3
Ассоциация П	8,8x10 ⁹	3	3	3	3
27	2,3x10 ⁹	3	3 -	3	3
8д	6,7x10 ⁸	3	3 -	3	3
127 А-4	6,3x10 ⁸	3	3 -	3+	3+

Примечание: - - ниже средней, + - выше средней.

Наибольшая адгезия у культур *L. Plantarum* 22-8/13, *L. plantarum* 2в, *L. plantarum* 14д и *L. fermentum* 127 отмечена в присутствии пищевых волокон и пектина. У других культур не выявлено существенного влияния указанных протекторов на адгезивную активность.

Повышение адгезии до 4 степени у штаммов *P. Shermanii* 15, 8, и 2/10 отмечено в присутствии пищевых волокон, желатозо-сахарозной среды. У штамма *P. shermanii* 5 не выявлено существенного влияния указанных протекторов на адгезивную активность.

Зависимость адгезивной активности исследуемых штаммов от различных факторов изучали также с использованием метода подсчета числа бактерий, прикрепившихся на эритроцитах. Учет результатов проводили по среднему показателю адгезии (СПА). При СПА от 0 до 1,0 микроорганизм считали неадгезивным, от 1,01 до 2,00 - низкоадгезивным, от 2,01 до 4,00 - среднеадгезивным и от 4,01 и более - высокоадгезивным. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Адгезивная активность бактерий, определенная методом подсчета клеток на эритроцитах

Штаммы бактерий	Средний показатель адгезии бактерий в зависимости от добавок мела и протекторов					
	исходная среда MRS	желатозо-сахарозная среда	пектин	пищевые волокна	бентонит	мел
27w	2,8	2,5	2,7	3,8	4,0	5,0
27 Ап-3	5,0	4,5	4,8	5,2	5,6	6,2
ПКБ 2/10	6,0	5,8	6,0	7,0	6,8	6,1
Б-3 А-26	6,5	5,8	5,2	7,2	7,0	6,6
27	5,0	4,6	4,8	5,0	5,3	4,8
14д А-24	4,3	4,5	5,7	5,8	6,2	4,5
Б-3 исходный	5,2	5,3	6,0	5,3	5,2	5,5
22 исходный	3,0	3,8	5,1	5,3	5,2	4,9
2в А-6	4,7	4,7	5,0	5,1	5,2	5,0
Ассоциация А-5	6,8	6,7	7,0	7,8	7,9	7,0
Ассоциация-П	2,5	2,5	3,2	3,8	4,0	4,2
<i>B.longum</i> 7w	6,4	6,4	6,5	7,0	6,9	6,4
<i>B.longum</i> 5	2,9	3,8	3,7	5,1	5,0	4,9
<i>B.longum</i> 6	2,5	3,9	3,4	5,2	5,3	5,0
<i>B.longum</i> 10	2,8	3,5	3,2	5,4	5,2	4,9
<i>B.bifidus</i> 9	2,7	3,2	3,5	5,3	5,0	4,8

Из данных таблицы видно, что исследованные штаммы молочнокислых, пропионовокислых и бифидобактерий обладают довольно высокой адгезивной активностью. При этом некоторые штаммы адгезируются в виде отдельных бактериальных клеток, а также агрегатов, которые почти полностью закрывают эритроциты. Средне адгезивными штаммами являются 27w, 22 исходный и ассоциация П. Наиболее высокой адгезивной активностью обладают 7w, Б-3 А-26 и ассоциация А-5 (СПА на среде MRS 6,4; 6,5 и 6,8, соответственно). Значительное повышение адгезивной активности при добавлении в питательную среду мела отмечено у культур 27w (с СПА 2,8 до 5,0), 27 Ап-3 (с 5,0 СПА до 6,2), 22 исх. (с 3,0 СПА до 4,9), ассоциации П (с 2,5 СПА до 4,2). На адгезию остальных штаммов мел не оказал существенного влияния.

При наличии в среде пектина клетки Б-3 и ПКБ почти полностью закрывают эритроциты.

Введение в качестве протекторов в состав питательной среды пищевых волокон и бентонита повысило адгезивную активность у штаммов 7w, 27w, ПКБ 2/10, ассоциации А-5. Пищевые волокна вызывают сильную агрегацию бактериальных клеток. Возможно, что в присутствии пищевых волокон бактерии поддерживают свою жизнеспособность посредством агрегации.

Таким образом, исследованные штаммы молочнокислых, пропионовокислых и бифидобактерий обладают довольно высокой адгезивной активностью, которая зависит от состава питательной среды.

Оптимальной питательной средой для молочнокислых бактерий, обеспечивающей высокую адгезивную способность, является MRS, для бифидобактерий - гидролизатно-молочная, для пропионовокислых бактерий - комбинированная. Отмечены межштаммовые различия в степени адгезии бактерий.

Выявлена зависимость адгезивной активности бактерий от протекторов, вносимых в препарат. Повышение адгезии у бактерий оказывают пищевые волокна, желатозо-сахарозная среда, бентонит.

Литература:

- 1 Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журнал Микробиология. - 2004. - № 1. - С. 84-92.
- 2 Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов // Биопрепараты. - 2003. - № 3. - С. 54.

3 Greene J.D., Klaenhammer T.R. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells // Appl. Envir. Microbiol.- 1994. - Vol. 60. - P. 4487-4494.

4 Reddy B.S., Rivenson A. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo-4,5 quinoline, a food mutagen // Cancer Res.- 1993. - Vol. 53. - P. 3914-3918.

5 Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L. et al. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria // Appl. Envir. Microbiol. - 2000. - Vol. 66. - P. 3692-3697.

6 Lievin V., Peiffer I., Hudault S. et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity // Gut. - 2000. - Vol.47. - P. 646-652.

7 Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // Am.J.Clin.Nutr. - 2001. - Vol.73. - P.365-373.

8 Гизатулина С.С. Изучение адгезивной способности грамотрицательных бактерий, выделенных от больных диареей // Сб. науч. трудов «Кишечные инфекции у детей». – М.: 1986. – С. 106-110.

9. Шаповал О.Г. Влияние доксорубина на адгезивные свойства кишечной палочки // Саратовский Научно-медицинский журнал. - 2008. – Т. 4. – С.33-36.

Түйін

Н.Н ГАВРИЛОВА,¹ И.А. РАТНИКОВА¹, К.БАЯҚЫШЕВА¹, З.Ж.ТҰРЛЫБАЕВА¹, С.Д. БЫШЕВА¹, А.С. КАМЗАЕВА¹, О.Г.ЧУГАЙ²

¹Қазақстан ЕМК «Микробиология және вирусология институты» ҒКБҒМҚР,
Алматы қ.

²Республикалық клиникалық ОСА мүгедеулерінің госпиталі Алматы қ.

ӘРТҮРЛІ ФАКТОРЛАРДЫҢ ӘСЕРІНЕ БАЙЛАНЫСТЫ ПРОБИОТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ АДГЕЗИВТІК БЕЛСЕНДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

Сүт қышқылы бактерияларының зерттеуге алынған штамдарының адгезивтік белсенділігі қоректік ортаның құрамына тығыз байланысты болатыны анықталды. Ең жоғарғы адгезивтік белсенділікті қамтамасыз ету үшін қолайлы орталарға; сүт қышқылы бактерияларына – МРС, бифидобактерияларға – сүт-гидролизаты, пропион қышқылы бактерияларына – құрама қоректік орталар жатады. Бактериялардың адгезивтік дәрежесінде штамм аралық айырмашылықтар болатыны белгілі болды. Бактериялардың адгезивтік белсенділігі препаратқа қосылатын протекторларға байланысты болатыны белгіленді. Тағамдық талшықтар, желатозо-сахароза қосылған қоректік орта, бентонит бактериялардағы адгезияны көтеруге көмектеседі.

Кілт сөздер: сүт қышқылы, пропион қышқылы, бифидобактерияларға, ассоциация, адгезия.

N.N. GAVRILOVA¹, I.A. RATNIKOVA¹, K. BAYAKYSHEVA¹,
Z.Zh. TURLYBAEVA¹, S.D. YBYSHEVA¹, A.S. KAMZAEVA¹, O.G. CHUGAY²

¹RSOE “Institute of Microbiology and Virology”, Committee of Science, Ministry of Education and Science, Almaty, Republic of Kazakhstan

²Republican Clinical Hospital for Disabled War Veterans, Almaty, Republic of Kazakhstan

STUDY ON ADHESIVE ACTIVITY OF PROBIOTIC BACTERIA DEPENDING ON VARIOUS FACTORS

Summary

Dependence of the adhesive activity of lactic acid bacterial strains on the composition of the culture medium was determined. The optimal nutrient medium for lactic acid bacteria, which provides high adhesive ability, is MRS, for bifidobacteria – hydrolyzate-milk medium, for propionic acid bacteria

– combined medium. Interstrain differences in the degree of bacterial adhesion were recorded. Dependence of bacterial adhesive activity on the added to the drug protectors was revealed. Dietary fibers, gelatinous-sucrose medium, bentonite contribute to the increase in the bacterial adhesion.

Key words: lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, bifidobacteria, associations, adhesion.

Current understanding of the mechanism for the positive effect of probiotics is their versatility associated with the suppression of pathogenic and opportunistic microorganisms due to the production of biologically active substances, competition for limited nutrients and adhesion sites on the intestinal wall, influence on the enzymatic activity of the gastrointestinal tract, and stimulation of the host immune system [1, 2, 3, 4].

The most important property of probiotic bacteria is the ensuring the colonization resistance, i.e., ability to protect the intestinal wall against the penetration into the internal environment both bacteria and toxins and toxic products of different origin [1, 5, 6].

In the complex of colonization resistance mechanisms, an important role belongs to antagonistic activity of probiotic culture, its ability to colonize the mucous membrane, which is formed of the adhesion of microorganisms to the intestinal epithelial cells, competition for binding receptor and blockade of adhesion and colonization of mucous membranes by pathogenic and opportunistic microbes involving both factors of immunoglobulin nature and nonspecific factors of host protection. Role of adhesins in different microorganisms is performed by surface-arranged fimbriae, antigens of protein or polysaccharide nature, lipoteichoic acid, phospholipids, etc. [2, 7]

Possessing high affinity with enterocyte receptor and adhering to them, members of the normal intestinal microflora thereby reduce the potential of pathogenic effect on the intestinal wall on the part of disease-producing microorganisms.

Therefore, one of the basic properties of probiotic microorganisms is the adhesive activity.

The aim of the investigation was studying the adhesive activity of probiotic bacteria form different groups depending on various factors.

Materials and methods

In the study, the following strains of bacteria were used: lactic acid bacteria - *Lactobacillus plantarum*-2c 2v/A-6, 22-8/13, 14d and 14d/A-24, *L. curvatus* 18d, *L. acidophilus* 27w and 4, *L. brevis* B- 3 and B-3/A-26, *L. casei* 173a and 139₁, *L. cellobiosus* 2/7, 28, 37n and 7_{n1}, *L. fermentum* 27, 27/Ap-3, 127 and 127/A-4 , *L. salivarius* 8d and 39n; bifidobacteria - *Bifidobacterium longum* 7w, 5, 6, 10 and *B. bifidus* 3 and 9, and propionic acid bacteria - *P. shermanii* 15, 8, 5 and 2/10.

To cultivate bacteria, the following culture media were used: for lactic acid bacteria - combination medium based on corn steep liquor, MRS and wort agar; for bifidobacteria – hydrolyzate-milk medium and semi-liquid MRS with cysteine; for propionic acid bacteria – combined medium and MRS with cobalt.

Determination of adhesion activity was carried out by the S.S. Gizatulina's method [8] in human erythrocytes. The activity was evaluated in degrees: 1 - negative adhesion, 2 - inadhesion, 3 - average adhesion, 4 - high adhesion.

To determine adhesive activity, the method of counting the number of bacteria adhering to erythrocytes was used [9]. Analysis of results was carried out by the average adhesion value (AAV). If AAV is from 0 to 1,0, microorganism is considered non-adhesive, from 1,01 to 2,00 – low adhesive, from 2,01 to 4,00 – medium adhesive, from 4,01 and more - highly adhesive.

Results and discussion

Studying dependence of the adhesive activity of lactic acid bacteria on the composition of the culture medium showed that under the growth on the combined medium and wort agar, in most cultures the adhesive capacity was absent. The cultures of *L. fermentum* 127/4 A, *L. brevis* B-3/A-26, *L. casei* 139 possess high adhesive activity when grown on wort agar, as well as on combined medium (Table 1).

Under the growth on MRS medium, all studied strains selected for introduction in the probiotics have adhesive ability. Strains of *L. cellobiosus* 28 and 37n, *L. casei* 173a, *L. plantarum* 22-8/13 have a high degree of adhesion (degree 4). The remaining strains displayed an average adhesion on this medium (degree 3).

Table 1 - Degree of adhesion of lactic acid bacteria on various culture media

Strains of lactic acid bacteria	Degree of adhesion on various culture media		
	combined	MRS	wort agar
<i>L. plantarum</i> -2B/A-6	3	3	3
<i>L. plantarum</i> -22	2	3	2
<i>L. plantarum</i> -22-8/13	3	4	3
<i>L. plantarum</i> -14д	2	3	2
<i>L. plantarum</i> -14д/A-24	2	3	2
<i>L. curvatus</i> 18д,	3	3	3
<i>L. acidophilus</i> 27w	2	3	2
<i>L. brevis</i> B-3	3	3	3
<i>L. brevis</i> B-3/A-26	4	3	4
<i>L. casei</i> 173a	3	4	3
<i>L. casei</i> 139 ₁	4	3	4
<i>L. cellobiosus</i> 2/7	2	3	2
<i>L. cellobiosus</i> 28	3	4	3
<i>L. cellobiosus</i> 37н	3	4	3
<i>L. cellobiosus</i> 7н ₁	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 27	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 27/Aп-3	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 127	2	3	2
<i>L. fermentum</i> 127/A-4	4	3	4
<i>L. salivarius</i> 8д	2	3	2
<i>L. salivarius</i> 39н	2	3	2

The dependence of the adhesive activity of individual cultures on the presence of calcium ions in the medium was revealed. Thus, a culture of *L. fermentum* 127/A-4 when grown on the combined medium without chalk possesses the second degree of adhesion, and with chalk – the fourth one. Association of *L. brevis* B-3 and *P. shermanii*-15 on the combined medium without chalk had 20 % of cells of the second degree of adhesion, and 80% - of the third degree; on a medium with chalk a number of bacterial cells with adhesive activity of the third degree increased to 90%.

During the investigation, the interstrain differences were observed in the degree of bacterial adhesion. Thus, strains 139 and 173a relating to the same species *L. casei*, were distinguished by their ability to adhesion. Strain of *L. casei* 139 possessed adhesive activity of the third degree when grown on combined medium, whereas in strain 173a the adhesive activity was absent. Similar results were obtained with other bacterial species.

As a result of studies, dependence of the adhesive activity of bifidobacteria on the nutrient medium used in culturing was determined. A weak adhesive activity was observed in *B. longum* 5, 6, 10 and *B. bifidus* 9 when culturing on the semisolid MRS medium. When grown on hydrolyzate-milk medium, all investigated strains of bifidobacteria possessed adhesive activity of the third degree (Table 2).

Table 2 - Degree of adhesion of bifidobacteria on various culture media

Strains of propionic acid bacteria	Degree of adhesion on various culture media		
	hydrolyzate-milk without chalk	hydrolyzate-milk with chalk	MRS with cysteine
<i>B. longum</i> 5	3	3	2
<i>B. longum</i> 6	3	3	3-
<i>B. longum</i> 10	3	3	2
<i>B. longum</i> 7w	3	3	3
<i>B. bifidus</i> 9	3	3	2

During studies, the interstrain differences in the degree of adhesion of these bacteria were recorded as well. The strain *B. longum* 7w possessed the maximum adhesive ability.

Dependence of adhesive activity on the composition of used for cultivation nutrient medium was also determined for propionic acid bacteria. (Table 3).

The absence of adhesion activity in *P. shermanii*, strains 5 and 15, when grown on the culture medium recommended for propionic acid bacteria (contains corn steep liquor, glucose, ammonium sulfate and cobalt chloride), was recorded.

When grown on the combined nutrient medium, all investigated strains of propionic acid bacteria possess adhesive activity of the third degree.

Table 3 - Degree of adhesion of propionic bacteria on various culture media

Strains of propionic acid bacteria	Degree of adhesion on various culture media		
	combined	MRS with cobalt	medium for PAB
<i>P. shermanii</i> 15	3	3	2
<i>P. shermanii</i> 8	3	3	3
<i>P. shermanii</i> 5	3	3	2
<i>P. shermanii</i> 2/10.	3	4	3

On the MRS medium with cobalt, the strain *P. shermanii*-2/10 possessed the fourth degree of adhesion, while the others had the third one.

No dependence of adhesive activity in the studied strains of propionic acid bacteria on the presence of calcium ions in medium was determined. This indicates the presence of one type of adhesins in these cultures.

During the research, the interstrain differences in the degree of adhesion of propionic acid bacteria were recorded. The strain *P. shermanii*-2/10 possesses the maximum adhesive ability.

Dependence of the bacterial adhesive activity on the protectors added to the drug (dietary fibers, pectin, gelatinous-sucrose medium, bentonite) was studied. Increase in adhesion to the degree 4 in strains of *Bifidobacterium* was recorded in the presence of dietary fibers and bentonite due to aggregation of the bacterial cells.

The results of studies on the dependence of adhesive activity of lactic acid bacteria on the added to the preparation protectors are presented in Table 4.

The maximum adhesion in cultures of *L. plantarum* 22-8/13, *L. plantarum* 2b, *L. plantarum* 14d and *L. fermentum* 127 was recorded in the presence of dietary fibers and pectin. In other cultures, no significant effect of these protectors on the adhesive activity was revealed.

Increased to the degree 4 adhesion in strains of *P. shermanii* 15, 8 and 2/10 was recorded in the presence of dietary fibers, gelatinous-sucrose medium. In the strain *P. shermanii* 5 no significant effect of these protectors on adhesive activity was detected.

Dependence of adhesive activity of the investigated strains on various factors was also studied using the method of counting the number of bacteria adhered on erythrocytes. Analysis of results was carried out by the average adhesion value (AAV). If AAV varies from 0 to 1,0, the microorganism is considered non-adhesive, from 1,01 to 2,00 – low adhesive, from 2,01 to 4,00 – medium adhesive, from 4,01 and above - highly adhesive. The results are given in Table 5.

The data given in the Table demonstrate that the studied strains of lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, and bifidobacteria have relatively high adhesive activity. However, some strains are adhered in the form of individual bacterial cells, as well as aggregates, which almost completely cover erythrocytes. 27w, 22 init., and association P are the medium adhesive strains. 7w, B-3 A-26 and association A-5 have the highest adhesive activity (AAV on the MRS medium are 6,4; 6,5 and 6,8, respectively). A significant increase in adhesion activity when adding a chalk to the medium was observed in the following cultures: 27w (AAV from 2,8 to 5,0), 27 Ap-3 (AAV from 5,0 to 6,2), 22 init. (AAV from 3 to 4,9), association P (AAV from 2,5 to 4,2). A chalk had no significant effect on adhesion in other strains.

Table 4 - Effect of protectors on the adhesive activity of lactic acid and propionic acid bacteria

Bacterial strains	Bacterial titer, CFU/mL	Degree of adhesion of bacteria depending on the added in liquid medium protectors			
		base	with gelatinous-sucrose medium	with pectin	with dietary fibers
7 _{H1}	4,5x10 ⁸	3	3 -	3 -	3
27Ap-3	6,2x10 ⁸	3	3 -	4	3
22-8/13	7,4x10 ⁸	3	3	3+	3+
14d	6,1x10 ⁸	3	3	3+	3+
39 _{H1}	3,7x10 ⁸	3	3	3	3
PAB -5	5,3x10 ⁸	3	3	3	3
PAB -8	6,2x10 ⁸	3	3	3	3
PAB -15	7,0x10 ⁸	3	3+	3	3+
PAB 2/10	9,5x10 ⁸	3	3+	3	3+
14d A-24	3,9x10 ⁸	3	2	3	3
28 original	1,5x10 ⁹	3	3	3	4
22 A-310	6,7x10 ⁸	3	3	3	3
27w	3,1x10 ⁸	3	3	3	3
2 _B A-6	1,5x10 ⁹	3	4	3	3
B-3	2,5x10 ⁸	3	4	4	3
A-5	1,9x10 ⁹	3	3	3	3
B-3 A-26	2,3x10 ⁹	3	3	3	3
Association II	8,8x10 ⁹	3	3	3	3
27	2,3x10 ⁹	3	3 -	3	3
8d	6,7x10 ⁸	3	3 -	3	3
127 A-4	6,3x10 ⁸	3	3 -	3+	3+

Note: - below average value, + - above average value

Table 5 - Adhesive activity of bacteria as determined by counting of cells on erythrocytes

Bacterial strains	Average adhesion value of the bacteria depending on adding chalk and protectors					
	base MRS medium	gelatinous-sucrose medium	pectin	dietary fibers	bentonite	chalk
27w	2,8	2,5	2,7	3,8	4,0	5,0
27 Ap-3	5,0	4,5	4,8	5,2	5,6	6,2
PAB 2/10	6,0	5,8	6,0	7,0	6,8	6,1
B-3 A-26	6,5	5,8	5,2	7,2	7,0	6,6
27	5,0	4,6	4,8	5,0	5,3	4,8
14 _Д A-24	4,3	4,5	5,7	5,8	6,2	4,5
B-3 original	5,2	5,3	6,0	5,3	5,2	5,5
22 original	3,0	3,8	5,1	5,3	5,2	4,9
2 _B A-6	4,7	4,7	5,0	5,1	5,2	5,0
Association A-5	6,8	6,7	7,0	7,8	7,9	7,0
Association-II	2,5	2,5	3,2	3,8	4,0	4,2
<i>B.longum</i> 7w	6,4	6,4	6,5	7,0	6,9	6,4
<i>B.longum</i> 5	2,9	3,8	3,7	5,1	5,0	4,9
<i>B.longum</i> 6	2,5	3,9	3,4	5,2	5,3	5,0
<i>B.longum</i> 10	2,8	3,5	3,2	5,4	5,2	4,9
<i>B.bifidus</i> 9	2,7	3,2	3,5	5,3	5,0	4,8

In the presence of pectin in the medium, cells B-3 and PAB almost completely cover erythrocytes.

Adding of dietary fibers and bentonite to the culture medium as protectors increased the adhesive activity in strains 7w, 27w, PAB 2/10, association A-5. Dietary fibers cause strong aggregation of the bacterial cells. It is possible that in the presence of dietary fibers bacteria maintain their viability by the aggregation.

Therefore, the studied strains of lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, and bifidobacteria possess a sufficiently high adhesive activity, which depends on the composition of the culture medium.

Optimum nutrient medium for lactic acid bacteria, which provides high adhesive ability, is MRS; for bifidobacteria – hydrolyzate-milk medium; for propionic acid bacteria – combined medium. The interstrain differences in the degree of adhesion of bacteria were recorded.

Dependence of the bacterial adhesive activity on the added to the preparation protectors was revealed. Increased adhesion in bacteria is induced by dietary fibers, gelatinous-sucrose medium, bentonite.

Reference:

1 Bondarenko V.M, Vorobyev A.A. Dysbiosis and preparations with probiotic function // Journal of Microbiology. - 2004. – No. 1. - P. 84-92.

2 Bondarenko V.M., Chuprinin R.P., Vorobyeva M.A. Mechanism for action of probiotics // Biopreparations. - 2003. – No. 3. - P. 54.

8 Gizatulina S.S. Study on adhesive ability of gram-negative bacteria isolated from patients with diarrhea // Collection of scientific papers “Intestinal infections in children”. - M., 1986. - P.106-110.

9 Shapoval O.G. Effect of doxorubicin on the adhesive properties of E. coli // Saratov Journal of Medical Research. - 2008. - Vol. 4. - P.33-36.