

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

УДК 582.929:615.322:579.61

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття
_____ **Олена КВАСКО**
« ____ » _____ 2025 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему «Виділення та ідентифікація перспективних пробіотичних штамів
Lactobacillus rhamnosus»**

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Гарант освітньої програми

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник кваліфікаційної роботи

Кандидат біологічних наук, доцент,
завідувач кафедри екобіотехнології
та біорізноманіття

_____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Виконала

_____ **Дар'я БОДНАР**
(підпис)

КИЇВ-2025

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
екобіотехнології
та біорізноманіття

к.б.н., доцент _____ Олена КВАСКО
« ____ » _____ 2025 р.

З А В Д А Н Н Я

на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студенту

Боднар Дар'ї Євгенівні

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської кваліфікаційної роботи: «Виділення та ідентифікація перспективних пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus*»

затверджена наказом ректора НУБіП України від “22” жовтня 2024 р. № 1880 “С”.

Термін подання завершеної роботи на кафедру 15 травня 2025 року.

Вихідні дані до бакалаврської кваліфікаційної роботи: природні джерела для виділення лактобактерій, селективне поживне середовище MRS, протоколи культивування, ідентифікації лактобактерій, оцінки пробіотичної активності.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Обрати природні джерела та виділити бактерії роду *Lactobacillus*
2. Провести фенотипову ідентифікацію виділених штамів.
3. Оцінити пробіотичну активність виділених штамів *L. rhamnosus*

Дата видачі завдання 23 жовтня 2024 року

Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи

Завдання прийняв до виконання

(підпис)

(підпис)

Олена КВАСКО

Дар'я БОДНАР

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота виконана на тему «Виділення та ідентифікація перспективних пробіотичних штамів *Lactobacillus rhamnosus*» в обсязі 62 сторінок комп'ютерного тексту формату А4, містить 1 рисунок, 4 таблиці, 85 використаних джерела. Складається з наступних розділів:

1. Огляд літератури;
2. Матеріали та методи дослідження;
3. Результати дослідження та їх обговорення.

Метою даної роботи було виділити штами *L. rhamnosus* із природних джерел, ідентифікувати та оцінити їх пробіотичний потенціал.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Обрати природні джерела та виділити бактерії роду *Lactobacillus*
2. Провести фенотипову ідентифікацію виділених штамів.
3. Оцінити пробіотичну активність виділених штамів *L. rhamnosus*

Об'єктом дослідження є процес виділення та ідентифікації штамів *L. rhamnosus*.

Предметом дослідження є штами *L. rhamnosus*, виділені з рослинної сировини.

В роботі застосовано такі **методи дослідження** як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Характеристика пробіотиків та їх роль у здоров'ї людини та тварин	9
1.2. Біологічні властивості <i>L. rhamnosus</i>	21
1.3. Методи виділення та ідентифікації бактерій	28
1.4. Критерії пробіотичних штамів	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	38
2.1. Об'єкт дослідження та методи виділення <i>L. rhamnosus</i>	38
2.2. Фенотипова ідентифікація штамів лактобактерій	40
2.3. Оцінка пробіотичних властивостей штамів <i>L. rhamnosus</i>	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	44
3.1. Виділення, кількісна та фенотипова характеристика <i>L. rhamnosus</i>	44
3.2. Оцінка пробіотичних властивостей штамів <i>L. rhamnosus</i>	46
ВИСНОВКИ	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	51

ВСТУП

Останнім часом актуальними є дослідження спрямовані на пошук нових ефективних пробіотичних штамів для застосування у харчовій, фармацевтичній та медичній галузях. У зв'язку з ростом антибіотикорезистентності, збільшенням частоти захворювань шлунково-кишкового тракту та зростанням попиту на функціональні продукти, особливе значення має виділення та вивчення властивостей штамів *Lactobacillus rhamnosus*, здатних забезпечувати захисну та імуномодулювальну дію. Мікробіота людини представлена широким спектром коменсальних мікроорганізмів, серед яких переважають бактерії, що локалізуються у шлунково-кишковому тракті. У кишечнику дорослої людини ідентифіковано понад 400 бактеріальних видів, що включають як аеробні, так і анаеробні форми [1]. Кишкова мікрофлора відіграє ключову роль у підтримці фізіологічних функцій епітелію, і її дисбаланс може бути пов'язаний із розвитком низки патологій [2, 3].

Одним із чинників позитивного впливу мікробіоти на організм є пробіотики - живі мікроорганізми, які, за умови достатнього надходження, чинять сприятливу дію на здоров'я людини. Корисні властивості пробіотиків включають регуляцію імунної відповіді, підтримку балансу мікрофлори кишечника, зниження рівня холестерину, артеріального тиску та профілактику інфекційних захворювань, зокрема діареї [9]. Найчастіше як пробіотики використовуються представники родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, а також деякі штами дріжджів [10]. Представники роду *Lactobacillus* є представниками нормальної природної мікрофлори кишечника, не патогенними, грампозитивними бактеріями, що мають низку корисних властивостей: антимікробна активність, сприяння кращому засвоєнню лактози, зниженню рівня холестерину та імуномодулювальні властивості [4–6].

Пробіотичні властивості є штам-специфічними, тому актуальним залишається пошук, виділення та ретельна характеристика ізолятів молочнокислих бактерій, зокрема, роду *Lactobacillus* з метою виявлення найбільш ефективних штамів. Основними критеріями для відбору перспективних пробіотиків є стійкість до дії низького рН шлункового соку та дії жовчних кислот, здатність до адгезії до епітеліальних клітин і слизу, антагоністична активність щодо патогенів, а також імуномодулювальні властивості [3, 7, 8, 11]. Показано, що деякі пробіотики продукують перекис водню, органічні кислоти та інші антимікробні сполуки, які пригнічують ріст патогенів [12, 13].

Особливу увагу останніми роками приділяють ізоляції пробіотичних штамів з природних джерел, таких як травний тракт людини, грудне молоко та молозиво, рослинні ферментовані продукти [17]. Серед молочнокислих бактерій, які традиційно використовуються у ферментації харчових продуктів, провідне місце займають представники роду *Lactobacillus*. Доведено, що окремі штами мають позитивний вплив на перебіг низки захворювань - від шлунково-кишкових розладів до алергічних та запальних станів, а також здатні покращувати біодоступність макроелементів, таких як кальцій і магній [18]. Разом з тим, деякі ізоляти молочнокислих бактерій можуть містити гени антибіотикорезистентності, що створює потенційний ризик горизонтального перенесення таких генів іншим бактеріям у мікробіоті кишечника. Це обумовлює необхідність обов'язкової оцінки резистентності до антибіотиків при відборі пробіотичних штамів [16]. У зв'язку з цим виділення, скринінг та оцінка пробіотичного потенціалу штамів *Lactobacillus* з природних джерел є актуальним напрямом сучасних мікробіологічних досліджень.

Враховуючи вище зазначене, **метою даної роботи** було виділити штами *L. rhamnosus* із природних рослинних джерел, ідентифікувати та оцінити їх пробіотичний потенціал.

Згідно поставленої мети було сформульовано наступні **завдання**:

1. Обрати природні рослинні джерела та виділити бактерії роду *Lactobacillus*
2. Провести первинну фенотипову ідентифікацію виділених штамів.
3. Оцінити пробіотичну активність виділених штамів *L. rhamnosus*

Об'єктом дослідження є процес виділення та ідентифікації штамів *L. rhamnosus*.

Предметом дослідження є штами *L. rhamnosus*, виділені з рослинної сировини.

В роботі застосовано такі методи дослідження як біотехнологічні, мікробіологічні, молекулярно-генетичні, а також статистичні.

Практична значущість даної роботи полягає у можливості виявлення нових штамів *L. rhamnosus* з природних рослинних субстратів, які можуть бути використані як перспективні пробіотики у виробництві функціональних харчових продуктів, біопрепаратів та засобів для корекції мікробіологічного балансу кишечника людини. Виділення штамів з адаптованих до рослинного середовища джерел підвищує ймовірність їхньої ефективності та життєдіяльності у складі ферментованих рослинних продуктів.

Робота виконувалась на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття факультету захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика пробіотиків та їх роль у здоров'ї людини та тварин

Пробіотики є живими мікроорганізми, які, за умови достатнього надходження, чинять сприятливу дію на здоров'я людини та є компонентами функціональних продуктів [19, 20]. Традиційно до пробіотичних мікроорганізмів належать види родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* [20], але останнім часом до них також відносять інші молочнокислі бактерії, такі як представники родів *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* і *Streptococcus*, а також деякі інші мікроорганізми, такі як *Saccharomyces sp* та *Bacillus sp* [20-22].

Пробіотичні мікроорганізми можуть входити до складу харчових продуктів або біологічно активних добавок - таблеток, капсул чи ліофілізованих форм [23]. Традиційно джерелом пробіотиків виступають ферментовані молочні продукти, проте останнім часом зростає зацікавленість у використанні альтернативних джерел для виділення пробіотичних культур, таких як овочі, фруктові соки (свіжі або ферментовані), продукти на основі злаків, напої та ферментовані м'ясні вироби [24]. Підвищений попит на немолочні пробіотичні продукти пов'язаний, зокрема, із вмістом лактози та холестерину у традиційних молочних продуктах, тому на ринку зростає кількість немолочних продуктів з пробіотиками, наприклад, фруктових соків та продуктів на основі вівса [23-25].

Кількість та життєздатність пробіотичних мікроорганізмів у продукті є ключовими чинниками, що забезпечують ефективність їх дії при вживанні [24]. Хоча основна увага приділяється живим клітинам, деякі дослідження свідчать про позитивний вплив і нежиттєздатних мікроорганізмів, особливо в якості імуномодуючих засобів [25]. Таким

чином, вибір харчового джерела або продукту-носія є важливим, оскільки він впливає на виживаність пробіотиків. На цей показник впливають такі фактори, як хімічний склад (вміст поживних речовин, рН, наявність кисню), кількість введеного інокулюму, взаємодія з іншими мікроорганізмами, тривалість ферментації (для ферментованих продуктів), умови та тривалість зберігання, зокрема температура [23-25].

Основними джерелами пробіотичних мікроорганізмів є шлунково-кишковий тракт людини та ферментовані молочні продукти. Значну кількість бактерій було виділено з фекальних зразків людини, оскільки штами, адаптовані до умов ШКТ, ймовірно, мають кращу виживаність при проходженні через нього [25]. Водночас ферментовані молочні продукти, особливо кисломолочні напої, містять складні консорціуми лактобацил і є ще одним важливим джерелом пробіотиків [26]. Окрім молочних субстратів, пробіотичні мікроорганізми також можуть бути виділені з немолочних ферментованих продуктів, зокрема рослинного походження, таких як квашені овочі. Штами, ізольовані з таких продуктів, можуть мати переваги при використанні в аналогічних за походженням пробіотичних продуктах, оскільки бактерії з інших джерел можуть не проявляти належної життєздатності у відповідному середовищі [25, 26]. Одним із прикладів таких продуктів є квашена капуста, яка утворюється внаслідок спонтанної ферментації капусти за анаеробних умов [23]. Процес ферментації триває кілька тижнів при температурі 15–20 °C і супроводжується мікробною сукцесією. Спочатку домінує гетероферментативна фаза, зумовлена активністю *Leuconostoc mesenteroides*, за якою слідує гомоферментативна фаза, в якій переважає *Lactobacillus plantarum* [23-26]. Наявність солі та анаеробні умови сприяють розвитку гетероферментативних мікроорганізмів, особливо *Leuconostoc mesenteroides* — основного виду молочнокислих бактерій у капусті. Ці бактерії знижують рН продукту,

створюючи сприятливі умови для розвитку гомоферментативних мікроорганізмів, які забезпечують другу фазу ферментації [25].

Характеристики пробіотичних мікроорганізмів

Вибір мікроорганізмів для використання як пробіотиків базується на наявності низки обов'язкових характеристик. Оскільки навіть штами одного виду можуть значно відрізнятися за властивостями, важливо спочатку точно ідентифікувати вид, а потім провести детальну характеристику конкретного штаму [23].

Перед впровадженням мікроорганізму у виробництво пробіотичних продуктів необхідно підтвердити його безпечність для людини. Загалом пробіотики мають позитивну історію безпечного застосування, однак у поодиноких випадках були зафіксовані небажані ефекти, пов'язані з їхнім вживанням. Наприклад, існують дані щодо виникнення ендокардиту, спричиненого представниками роду *Lactobacillus* [23], а також про фунгемію, викликану *Saccharomyces boulardii* [24]. Також є одне клінічне дослідження, яке показало підвищення смертності серед хворих на гострий панкреатит при вживанні пробіотиків [25], що на сьогодні є єдиним подібним зафіксованим випадком у клінічній практиці.

Ще одним важливим аспектом безпеки є потенційна здатність пробіотиків слугувати резервуаром генів антибіотикорезистентності. Резистентність може бути внутрішньою або набутою. Внутрішня резистентність притаманна всім представникам певного виду або роду та не передається іншим мікроорганізмам. Натомість набута резистентність властива лише окремим штамам і може виникати внаслідок випадкових мутацій або горизонтального переносу генів [25, 26]. Особливу занепокоєність викликає горизонтальна передача генів за допомогою плазмід або транспозонів, що підвищує ризик поширення резистентності серед патогенних мікроорганізмів [26].

У країнах Європейського Союзу мікроорганізми, що використовуються у харчовій промисловості, повинні відповідати вимогам концепції «кваліфікованого припущення безпеки» (Qualified Presumption of Safety, QPS). Відповідно до цієї концепції, мікроорганізми з доведеною безпекою включаються до переліку дозволених груп, і для їх використання достатньо підтвердити відсутність факторів вірулентності (наприклад, гемолітичної активності) та генів антибіотикорезистентності [24].

Функціональні характеристики пробіотичних мікроорганізмів

Для реалізації пробіотичного ефекту та забезпечення користі для організму-господаря мікроорганізм повинен мати низку функціональних властивостей. Найважливішими серед них є здатність витримувати умови шлунково-кишкового тракту та здатність до адгезії на слизовій оболонці кишечника.

Однією з ключових вимог до пробіотичного штаму є виживання під час проходження через шлунково-кишковий тракт з подальшою колонізацією організму людини [25]. На цьому шляху пробіотики стикаються з різноманітними стресовими факторами, зокрема агресивним середовищем шлунку, де рівень рН може змінюватися від 1–2 до 4–5, а також дією ферментів, таких як пепсин [26-27]. Після проходження через шлунок пробіотики потрапляють до тонкого кишечника, де рН є вищим (>6), але присутні жовчні солі, панкреатин, ліпаза та інші агресивні компоненти [27].

Оцінювання виживаності штамів у таких умовах проводиться за допомогою різних методів: використання буферних розчинів або середовищ з низьким рН чи жовчними солями, моделювання умов ШКТ із застосуванням штучних шлункових і панкреатичних соків, а також *in vitro* систем, що імітують функції шлунково-кишкового тракту [26].

Адгезія до слизової оболонки кишечника або до епітеліальних клітин вважається важливою позитивною властивістю, оскільки сприяє

колонізації пробіотики в організмі та запобігає прикріпленню патогенних мікроорганізмів [25]. Проте в певних випадках, зокрема у пацієнтів з ослабленим імунітетом, надмірна адгезивність може становити ризик через потенційну транслокацію мікроорганізмів і інвазію в тканини ШКТ [24].

Для оцінки здатності до адгезії застосовують різноманітні методи, зокрема дослідження автоагрегації, моделі з використанням слизу кишечника, епітеліальних клітин, фрагментів кишкової тканини, а також складні *in vitro* системи, які моделюють взаємодію пробіотики з епітелієм, слизом та мікробіотою кишечника [26].

Користь пробіотиків для здоров'я людини

Пробіотики можуть чинити низку позитивних ефектів на організм людини, зокрема у лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту. Деякі з цих ефектів вже науково підтверджені, інші - лише частково досліджені та потребують подальшого вивчення. Важливо відзначити, що корисні властивості пробіотиків є штам-специфічними: доведені ефекти можуть стосуватися лише конкретного штаму або групи штамів, і наразі не існує універсального штаму, який би забезпечував усі можливі переваги [23, 24]. Крім того, відповідь на пробіотики може змінюватись залежно від стану здоров'я окремого індивіда [24].

Одним з основних побічних ефектів антибіотикотерапії є антибіотик-асоційована діарея, частота якої може становити від 5% до 39% залежно від типу антибіотику [25]. Основною причиною антибіотик-асоційованої діареї є інфекція, спричинена *Clostridium difficile*, яка становить близько 15–25% усіх випадків. Внаслідок порушення мікробіоти після антибіотикотерапії створюються умови для росту цього умовно-патогенного мікроорганізму, що продукує токсини та спричиняє захворювання [25, 26]. *C. difficile*-інфекції є поширеними в умовах стаціонару та можуть призводити до серйозних ускладнень, особливо у літніх пацієнтів.

Застосування пробіотиків для профілактики та лікування антибіотик-асоційованої діареї є одним з найбільш доведених ефектів. Ефективність пробіотиків у лікуванні антибіотик-асоційованої діареї, зокрема таких родів, як *Saccharomyces*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, підтверджена експериментальними дослідженнями [26]. Найефективнішим у профілактиці антибіотик-асоційованої діареї вважається *Saccharomyces boulardii*, а *Lactobacillus rhamnosus GG* показує ефективність у дітей [25]. У випадку інфекцій, спричинених *C. difficile*, *S. boulardii* ефективно запобігає рецидивам хвороби [25, 26].

Інфекційний гастроентерит є групою захворювань, спричинених різноманітними збудниками (вірусами, бактеріями, найпростішими), і часто виникає після вживання забрудненої їжі або води. У дітей до трьох років переважають вірусні патогени, а у старших - бактеріальні [24, 25]. Ефективність пробіотиків у лікуванні інфекційного гастроентериту, особливо у дітей, підтверджено низкою експериментальних досліджень. Найбільш ефективним пробіотиком вважається *Lactobacillus rhamnosus GG*, який зменшує тривалість та частоту симптомів [26]. Позитивні результати також отримано для *S. boulardii*, а також штамів *L. reuteri*, *Bifidobacterium animalis* Bb12 і *Lactobacillus paracasei* ST11 [27].

Некротизуючий ентероколіт є однією з основних причин захворюваності та смертності у недоношених немовлят. Це захворювання вражає приблизно 7% новонароджених з дуже низькою масою тіла при народженні, а рівень летальності становить 20–30%. Етіологія некротизуючого ентероколіту остаточно не з'ясована, але серед основних чинників ризику розглядаються недоношеність, штучне вигодовування, порушення складу мікробіоти, неонатальний стрес та тривала антибіотикотерапія [26]. Результати досліджень показують ефективність пробіотиків у профілактиці та лікуванні некротизуючого ентероколіту: зменшується як частота виникнення, так і рівень смертності без

негативного впливу на ріст та розвиток дітей. До того ж, ефективність продемонстрували різні підгрупи пробіотиків - штами *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Saccharomyces* [27].

Запальні захворювання кишечника охоплюють низку хронічних запальних патологій шлунково-кишкового тракту, які характеризуються порушенням бар'єрної функції кишківника, запаленням та утворенням виразок [25]. Найпоширенішими формами є хвороба Крона та виразковий коліт. Хвороба Крона може вражати будь-який відділ шлунково-кишкового тракту і має вогнищевий характер із глибокими виразками, тоді як виразковий коліт обмежується товстим кишечником та прямою кишкою і проявляється як безперервне запалення з поверхневими виразками. Ефективність пробіотиків при запальних захворюваннях кишечника залежить від форми захворювання [26, 27].

Синдром подразненого кишечника є хронічним функціональним порушенням, яке спостерігається у 5–20% населення. Він характеризується болем у животі, здуттям та змінами характеру дефекації [27]. Застосування пробіотиків має позитивний ефект у терапії синдрому подразненого кишечника як у дітей, так і у дорослих. Вони сприяють зменшенню загальних симптомів, особливо болю в животі [26]. Проте деякі клінічні дослідження мають обмежену якість, тому необхідні більш добре сплановані випробування [25]. Позитивні результати показали штами з родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, а також їх комбінації. Зокрема, штам *Bifidobacterium infantis* 35623 виявився ефективним щодо зменшення всіх основних симптомів синдрому подразненого кишечника [27].

Пробіотики також досліджувалися на предмет їх ефективності у лікуванні інфекції, спричиненої *Helicobacter pylori*, яка може призводити до хронічного гастриту, виразкової хвороби шлунка та підвищеного ризику розвитку раку шлунково-кишкового тракту. Особливо перспективним є

використання *Saccharomyces boulardii* як допоміжного засобу в комбінованій терапії цієї інфекції [27].

Пробіотики також досліджуються як потенційні складові при лікуванні алергічних захворювань, таких як астма, алергічний риніт, atopічний дерматит та atopічна екзема. Ці хвороби пов'язані з підвищеним рівнем імуноглобуліну Е, що виникає внаслідок порушення балансу між Т-хелперами 1 та 2 типу з переважанням останнього [26]. Дослідження показали, що використання пробіотиків є ефективним при алергічному риніті та може запобігати розвитку atopічного дерматиту у дітей [24]. Цікаво, що навіть інактивовані (тепловим шляхом) пробіотичні клітини здатні покращувати баланс Т-хелперів та знижувати продукцію IgE *in vitro* і в експериментальних тварин, що свідчить про можливу ефективність не лише життєздатних клітин [26].

Існують також докази того, що пробіотики сприяють профілактиці та зменшенню тяжкості респіраторних інфекцій. Зокрема, прийом пробіотиків може знизити ризик виникнення гострих інфекцій верхніх дихальних шляхів та зменшити потребу в антибіотикотерапії [24]. У дітей пробіотики знижують ризик рецидивуючих респіраторних інфекцій протягом першого року життя, а в дорослих зменшують тривалість та тяжкість симптомів, хоча не впливають на їх частоту [26]. У людей похилого віку пробіотичні продукти особливо ефективні при інфекціях верхніх дихальних шляхів, включаючи назофарингіт [26].

Роль пробіотиків у профілактиці онкологічних захворювань також активно досліджується. Зокрема, встановлено, що пробіотичні лактобактерії можуть пригнічувати проліферацію пухлинних клітин у тварин [23, 25]. Крім того, описано й інші можливі позитивні ефекти пробіотиків, серед яких: покращення перебігу целиакії, сприяння зниженню ваги, покращення настрою та зниження рівня тривожності [23-26].

Механізми дії пробіотиків

Пробіотики можуть чинити позитивний вплив на організм людини через низку механізмів, які умовно поділяються на три основні групи (рис. 1.1.1):

1. Взаємодія з організмом хазяїна;
2. Взаємодія з іншими мікроорганізмами;
3. Взаємодія з молекулами у шлунково-кишковому тракті.

Як і у випадку з корисними властивостями, різні штами пробіотиків можуть мати різні механізми дії [23-26].

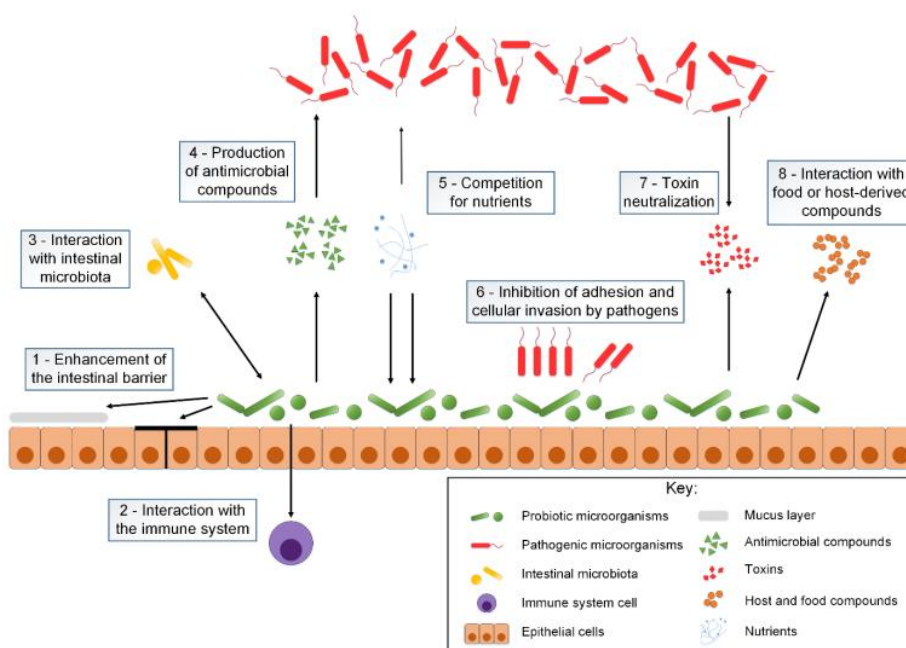


Рис. 1.1.1. Механізми дії пробіотичних мікроорганізмів: взаємодія з хазяїном (1 — посилення кишкового бар'єру, або шляхом зміцнення епітеліального бар'єру, або шляхом вироблення слизу; 2 — взаємодія з імунною системою, сприяючи або про-, або протизапальній реакції); взаємодія з мікроорганізмами (3 - пряма або опосередкована взаємодія з кишковою мікробіотою; 4 - вироблення антимікробних сполук; 5 - конкуренція за обмежені поживні речовини; 6 - пригнічення адгезії та

клітинної інвазії патогенів; 7 - нейтралізація та інгібування токсинів); 8 - взаємодія зі сполуками, присутніми в кишковому середовищі (такими як мутагенні сполуки) [23].

Взаємодія з організмом хазяїна

Кишковий бар'єр є важливим елементом захисту організму. Його порушення може призвести до проникнення патогенів або до активації запальних процесів у відповідь на бактеріальні та харчові антигени. Першим захисним бар'єром є слизовий шар, що вкриває епітелій кишечника та складається з великих глікопротеїнів — муцинів. Доведено, що деякі пробіотичні штами здатні стимулювати експресію генів муцину та посилювати його секрецію в клітинних культурах та тваринних моделях [25].

Щільні міжклітинні контакти між ентероцитами забезпечують структурну цілісність епітеліального шару та регулюють проникність тканини. Пробіотики, зокрема *Lactobacillus casei* DN-114-001, можуть підтримувати та відновлювати структуру цих контактів шляхом активації експресії або перерозподілу відповідних білків [26]. Крім того, пробіотики здатні інгібувати апоптоз клітин епітелію, зменшувати ушкодження слизової та стимулювати ріст клітин. Було виявлено, що два білки, що синтезуються *Lactobacillus rhamnosus* GG, активують сигнальні шляхи, які забезпечують ці ефекти [24].

Клітини Панета тонкого кишечника виробляють антимікробні пептиди, які зміцнюють кишковий бар'єр та запобігають інфекціям. Розпізнавання клітинними рецепторами структурних компонентів пробіотиків, таких як клітинна стінка або джгутики, стимулює секрецію цих пептидів як *in vitro*, так і *in vivo* [26].

Пробіотики також впливають на імунні клітини, зокрема дендритні клітини та Т-лімфоцити. Вони взаємодіють з мікроорганізмами у просвіті кишечника через розпізнавання молекулярних патернів рецепторами,

наприклад, Toll-подібними рецепторами (TLRs), що запускає сигнальні каскади, які можуть викликати як про-, так і протизапальну відповідь. При цьому активується синтез відповідних цитокінів. Наприклад, *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. casei* та VSL#3 стимулюють продукцію інтерлейкіну-10 (протизапального цитокіну) та/або пригнічують синтез прозапальних цитокінів [23, 26]. Цитокіни також можуть вироблятися іншими клітинами, такими як ентероцити та клітини товстої кишки. Наприклад, *L. rhamnosus* GG може знижувати продукцію інтерлейкіну-8 (прозапального цитокіну) в цих клітинах [23-26].

Деякі штами пробіотичних мікроорганізмів також можуть стимулювати диференціювання В-клітин у плазматичні клітини, що сприяє підвищенню продукції секреторного імуноглобуліну А (IgA). Ці антитіла зв'язуються з патогенними мікроорганізмами у слизовому шарі та перешкоджають їх адгезії до епітелію [27].

Взаємодія пробіотичних мікроорганізмів з іншими мікроорганізмами

Пробіотичні мікроорганізми здатні взаємодіяти з іншими представниками мікробіоти шлунково-кишкового тракту, зокрема з патогенними та коменсальними мікроорганізмами. Одним із ключових механізмів такої взаємодії є вплив на метаболічні мережі в кишечнику, що призводить до зміни мікросередовища. Крім того, пробіотики можуть ефективно конкурувати з патогенами за обмежені ресурси, такі як вуглеводи та залізо, що сприяє пригніченню розмноження патогенних бактерій [26, 27]. Ще одним важливим механізмом є конкуренція за адгезію до епітеліальних клітин — так звана конкурентна ексклюзія. Вона полягає у зв'язуванні як пробіотичних, так і патогенних мікроорганізмів до однакових рецепторів на поверхні епітелію, що перешкоджає закріпленню та колонізації патогенів, зокрема *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* та окремих штамів *E. coli* [25].

Деякі пробіотичні штами також здатні запобігати проникненню патогенів до епітеліальних клітин господаря. Цей ефект опосередковується біоактивними речовинами, які секретуються пробіотичними клітинами без потреби в прямому контакті [26]. Так, деякі сполуки, що здатні синтезувати окремі штами *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* можуть пригнічувати інвазію *Salmonella Typhimurium*.

Пробіотики також продукують широкий спектр антимікробних речовин, зокрема органічні кислоти, перекис водню та бактеріоцини. Органічні кислоти, як основні продукти ферментації молочнокислих бактерій, знижують рН середовища в кишечнику, що створює несприятливі умови для росту патогенних мікроорганізмів [25]. Бактеріоцини — це низькомолекулярні, термостабільні антимікробні пептиди. Більшість із них характеризуються вузьким спектром дії, спрямованим переважно на близькоспоріднені бактерії, однак деякі бактеріоцини мають широкий антимікробний потенціал. Наприклад, *Lactobacillus salivarius* UCC118 продукує бактеріоцин, який забезпечує захист мишей від інфекції, спричиненої *Listeria monocytogenes* [25].

Іншим важливим напрямом пробіотичної активності є здатність інгібувати продукцію токсинів патогенами або нейтралізувати токсини. Встановлено, що деякі штами пробіотиків можуть пригнічувати експресію шига-токсину *E. coli* O157:H7 завдяки утворенню органічних кислот. *Lactobacillus rhamnosus* також демонструє здатність до нейтралізації токсичних сполук, таких як мікотоксини або токсини ціанобактерій, шляхом зв'язування токсинів, зниження їх абсорбції в кишечнику та підвищення виведення з організму. Дріжджі *Saccharomyces boulardii* проявляють захисну дію щодо токсину А *Cl. difficile* шляхом блокування його дії, стимуляції секреції імуноглобуліну А та продукції специфічної протеази [27].

1.2. Біологічні властивості *Lactobacillus rhamnosus*

Серед різних штамів *Lactobacillus*, які вважаються пробіотиками, широко вивчається *Lacticaseibacillus rhamnosus*, раніше відома як *Lactobacillus rhamnosus* [28]. Окремі штами, що належать до виду *L. rhamnosus*, широко використовуються як пробіотики в харчових продуктах, лікувально-профілактичних та функціональних продуктах харчування [29]. Штам *L. rhamnosus* GG (Gorbach-Goldin), один з найбільш добре задокументованих пробіотичних мікроорганізмів, вперше виділений із зразків фекалій здорової дорослої людини, був визначений як потенційний пробіотичний штам [30]. Він вважається пробіотиком завдяки своїй стійкості до низького рН і жовчних кислот, а також хорошим ростовим характеристикам, які дозволяють йому виживати і зберігатися в шлунково-кишковому тракті людини [31]. Також повідомляється, що він має високу стійкість до технологічних процесів і велику здатність до адгезії до епітеліального шару кишечника, що згодом пригнічує ріст і адгезію деяких патогенних мікроорганізмів [32, 33].

Lacticaseibacillus rhamnosus може виживати в шлунково-кишковому тракті, прикріплюючись до клітин кишкового епітелію. Цей мікроорганізм показав себе як більш перспективний штам лактобактерій у порівнянні зі спорідненими штамми, такими як *Lactobacillus johnsonii* LJ1 та *Lacticaseibacillus casei* Shirota [34]. Крім того, *L. rhamnosus* здатний утворювати біоплівки, що підвищує його здатність захищати і зміцнювати цілісність цитоскелету для пригнічення колонізації патогенів [35]. Сильна адгезивна здатність та ефективність *L. rhamnosus* проти патогенів шлунково-кишкового тракту була показана *in vitro*, а також *in vivo* на добровольцях [36]. *L. rhamnosus* GG має високу адгезивну здатність до слизової оболонки кишечника [37]. *L. rhamnosus* GG здатний пригнічувати *Salmonella enterica* subsp. *enterica in vitro* [38] та *Shigella sonnei in vitro* [39].

Серед інших переваг *L. rhamnosus* вартовідмітити його клінічні переваги. Для того, щоб будь-який мікроорганізм мав клінічні ефекти, він повинен колонізувати шлунково-кишковий тракт, а *L. rhamnosus*, як було показано в різних дослідженнях, має ці властивості [28]. *L. rhamnosus* GG може бути використаний для профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій та діареї у дітей [40]. При застосуванні у дітей він здатен скоротити тривалість діареї та ризик зараження внутрішньолікарняними шлунково-кишковими інфекціями. Вживання *L. rhamnosus* GG запобігає колонізації кишечника грибами роду *Candida* [41] та лікує рецидивуючий коліт, спричинений *Clostridium difficile*, у дітей [42]. Крім того, *L. rhamnosus* HN001 (HN001) позитивно впливає на симптоми материнської депресії та тривоги під час післяпологового періоду-показано значно нижчі показники депресії та тривоги у жінок, які отримували цей штам [42].

L. rhamnosus є добре вивченою молочнокислою бактерією, яка володіє бажаними властивостями традиційних пробіотичних штамів, зокрема, зберігає життєздатність у стресових умовах шлунково-кишкового тракту, таких як низьке рН та наявність жовчних солей [43]. *L. rhamnosus* GG характеризується високою кислото- та жовчетолерантністю, що робить його одним із найбільш вивчених та широко застосовуваних пробіотиків у функціональних продуктах [36, 44]. Попереднє культивування з пребіотиками підвищує стійкість *L. rhamnosus* до умов, що моделюють транзит через шлунково-кишковий тракт, зокрема, здатність виживати при низькому рН та присутності жовчних солей до 2 % [45-47].

Одним із ключових механізмів пробіотичної дії *L. rhamnosus* є здатність пригнічувати ріст патогенів та запобігати їх колонізації. Це досягається завдяки адгезії до епітеліальних клітин, зміцненню бар'єрної функції кишечника та модуляції імунної відповіді. Зокрема, штам *L. rhamnosus* GG має антагоністичну активність щодо *Salmonella enterica*,

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus pneumoniae* та інших патогенів *in vitro* [48]. *L. rhamnosus* GG здатен знижувати адгезію патогенів, таких як *S. aureus*, до епітелію кишечника до 44%, а також захищати кератиноцити від патогенних ефектів *S. aureus*. Крім того, *L. rhamnosus* запобігає порушенню клітинного бар'єру при інфікуванні *E. coli* та захищає клітини від цитотоксичної дії токсинів *Clostridium difficile* [49].

Антимікробна дія *L. rhamnosus* також пов'язана з продукцією бактериоцинів (наприклад, rhamnocin 519) та органічних кислот, зокрема молочної [39, 50]. Ці сполуки пригнічують широкий спектр мікроорганізмів: *L. monocytogenes*, *S. mutans*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* та ін. Крім того, деякі штами *L. rhamnosus* здатні продукувати біосурфактанти з антибіофільними властивостями [51-52].

In vivo дослідження також підтверджують антипатогенну активність *L. rhamnosus*. Зокрема, *L. rhamnosus* GG за механізмом конкуренції за адгезивні структури (пілі) ефективно пригнічував колонізацію *Enterococcus faecium*. Бактеріоцини, виділені з *L. rhamnosus*, мають протимікробну активність проти *S. aureus* після ендопротезування у кролів, проти *Salmonella enterica* у новонароджених мишей через підвищення експресії протизапальних цитокінів та збереженню бар'єрної функції кишечника, що дозволило врятувати 80% тварин [53].

Адгезивні властивості *L. rhamnosus* сприяють зміцненню епітеліального бар'єра, що забезпечує ефективне пригнічення патогенних мікроорганізмів [36]. Завдяки цій здатності, штам *L. rhamnosus* GG є одним із найкраще досліджених пробіотиків, який широко застосовується для профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій [54]. *L. rhamnosus* GG здатний до адгезії та колонізації епітеліальних клітин як *in vitro*, так і *in vivo*. Зокрема, він використовує білкові компоненти, такі як субодиниця SpaC для зв'язування з муцином і кишковим епітелієм, а також білок MabA - для прикріплення до клітин і формування біоплівки [55]. Крім того,

штами *L. rhamnosus* виявляють здатність до зв'язування з фібронектином і ламініном - ключовими компонентами позаклітинного матриксу [56]. *L. rhamnosus* GG може зберігати цілісність епітеліального бар'єра, запобігаючи морфологічним змінам, індукованим *E. coli*, зменшувати рівень колонізації *E. coli* в кишківнику новонароджених щурів, що свідчить про профілактичний потенціал пробіотика при неонатальному сепсисі та менінгіті. Попередня обробка ентероїдних культур *L. rhamnosus* GG попереджує підвищену парацелюлярну проникність, зберігаючи бар'єрну функцію епітелію [57]. *L. rhamnosus* має здатність до імуномодулювання, зокрема - захисту кишкових епітеліальних клітин від апоптозу та стимуляції власної проліферації *in vitro* [36]. Ці ефекти частково зумовлені структурою пілій бактерії. Зокрема, штам CRL1505 може підвищувати резистентність до *Streptococcus pneumoniae* в імунокомпетентних мишей, а також активувати вроджені імунні клітини. Введення CRL1505 може нормалізувати системну та респіраторну імунну відповідь у мишей. Крім того, цей штам ефективно пригнічує колонізацію пневмококів [58]. На клітинному рівні, пілії SpaCBA відіграють ключову роль у прикріпленні *L. rhamnosus* до епітелію та макрофагів, що є необхідною умовою для реалізації імуномодулювальних ефектів. Було показано, що такі взаємодії сприяють продукції протизапального IL-10 та зниженню рівня IL-6 [59].

L. rhamnosus може стимулювати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь. Наприклад, введення *L. rhamnosus* GG підвищувало антитілоутворення у мишей, а також модулювало імунну відповідь при *Giardia*-інфекціях. Живі клітини *L. rhamnosus* GG та їх розчинні метаболіти виявили потенціал у зменшенні алергічних реакцій у неонатальному періоді, а штам LA68 стимулював вроджений імунітет у здорових мишей. Споживання ферментованого молока з *L. rhamnosus* позитивно впливало на розвиток імунної системи у новонароджених дітей і відновлювало баланс між Th1/Th2 [60].

L. rhamnosus, окрім пробіотичних властивостей, вважається клінічно релевантним штамом, що активно використовується у складі комерційних пробіотичних препаратів. Одним із найбільш вивчених клінічних ефектів є профілактика та лікування антибіотико-асоційованої діареї, особливо у дітей. Антибіотико-асоційована діарея виникає внаслідок дисбіозу, спричиненого застосуванням антибіотиків, і супроводжується порушенням мікробіоти кишечника. Пробіотики, зокрема *L. rhamnosus*, здатні відновлювати баланс мікрофлори та зменшувати тривалість і тяжкість діареї [36, 40]. Клінічні дослідження підтвердили ефективність штаму LGG у профілактиці антибіотико-асоційованої діареї у дітей [40, 61]. Ефективність *L. rhamnosus* у профілактиці антибіотико-асоційованої діареї пов'язують із його високою адгезивністю до кишкового слизу [36], що забезпечує конкурентне витіснення патогенів. Крім того, він має профілактичні та терапевтичні властивості і щодо інших інфекцій [36, 40].

Використання *L. rhamnosus* демонструє потенціал у зниженні запальних процесів. Зокрема, білки p40 і p75, виділені з *L. rhamnosus*, мають протизапальну дію, отже, може розглядатися як профілактичний та терапевтичний засіб для запальних захворювань [62].

Пробіотики, зокрема представники молочнокислих бактерій, мають здатність пригнічувати абсорбцію холестерину та стимулювати його ефлюкс шляхом активації печінкового X-рецептора, що сприяє зниженню загального рівня холестерину в організмі. *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* можуть слугувати потенційними гіпохолестеринемічними агентами. Таким чином, споживання пробіотичних продуктів може бути ефективним засобом профілактики серцево-судинних захворювань. Механізм гіпохолестеринемічної дії *L. rhamnosus* пов'язаний із його здатністю до декон'югації жовчних кислот. Такі властивості виявлено у штаму *L. rhamnosus* BFE 5264, що активує печінковий X-рецептор у макрофагах,

стимулюючи ефлюкс холестерину. Цей штам знижує накопичення холестерину та розвиток атеросклерозу у мишей [63].

Оцінка ефективності та безпечності пробіотичних мікроорганізмів є ключовою умовою для їхнього клінічного використання. Одним із важливих критеріїв відбору є відсутність ризику горизонтального переносу генів антибіотикорезистентності у шлунково-кишковому тракті. Пробіотики не повинні чинити негативного впливу на організм людини або виступати джерелом передачі резистентності до антибіотиків. Важливо досліджувати чутливість пробіотичних штамів до антибіотиків, оскільки за наявності генів резистентності вони можуть передаватися іншим мікроорганізмам, зокрема через плазміди. Деякі представники молочнокислих бактерій, включаючи *Lactobacillus spp.*, здатні накопичувати гени стійкості. Однак *L. rhamnosus* GG не містить плазмід і не передає стійкість до ванкоміцину ентерококам [64].

Для ефективного впливу пробіотики повинні зберігати життєздатність на рівні не менше ніж 10^6 КУО/г під час зберігання та споживання. *L. rhamnosus* демонструє високу толерантність до технологічних стресів, таких як осмотичне навантаження, висока концентрація солі, низькі/високі температури, що дозволяє включити його до широкого спектра харчових продуктів. Інтерес до безмолочних носіїв пробіотиків зростає, особливо серед споживачів з непереносністю лактози. Фруктові соки, завдяки відсутності стартових культур, високому вмісту вітаміну С і антиоксидантів, є перспективною альтернативою. Було показано, що *L. rhamnosus* зберігає життєздатність у фруктових соках протягом тривалого зберігання, особливо при мікрокапсулюванні.

Важливо також забезпечити виживання пробіотиків у шлунково-кишковому середовищі. *L. rhamnosus*, включений до фруктових напоїв, зберігає високу життєздатність як в *in vitro*, так і в *in vivo* моделях. Це свідчить про можливість використання даного пробіотика у широкому

спектрі харчових продуктів для споживачів з різними дієтичними уподобаннями [65, 66, 67].

Розуміння механізмів дії пробіотиків і циклів інфекції патогенів сприяло розвитку напрямку патобіотехнології - галузі, що передбачає використання вірулентних стратегій патогенних бактерій для створення біомедичних і промислових продуктів. Такий підхід дозволяє розробляти пробіотичні штами з підвищеною життєздатністю, здатністю колонізувати шлунково-кишковий тракт, пролонгованим зберіганням, а також застосовувати їх як носії для доставки вакцин, лікарських препаратів і терапевтичних білків. Одним із перспективних підходів є створення рекомбінантних пробіотиків, здатних до конкурентного інгібування патогенів за рахунок експресії гетерологічних генів патогенів, які кодують адгезивні білки. Таким чином, модифіковані штами можуть займати рецептори, до яких зв'язуються патогени, і запобігати колонізації. Однак ризики, пов'язані з використанням живих ослаблених патогенів, зокрема можливість їх реверсії у вірулентну форму, обмежують практичне застосування таких стратегій. У цьому контексті безпечнішою альтернативою є генетично модифіковані пробіотики, зокрема *L. rhamnosus*, що експресують білки з антипатогенними властивостями. Наприклад, пілі SraCBA *L. rhamnosus* GG є ключовими для адгезії до епітеліальних клітин кишківника, лектини Llp1 і Llp2 мають виражену антибіоплівкову активність щодо *Salmonella* spp. та *E. coli*, а також сприяють адгезії до урогенітальних епітеліальних клітин. Для дослідження адгезивних властивостей рекомбінантних штамів можна використати експресію флуоресцентних білків у *L. rhamnosus* GG та GR-1. Такий підхід дозволив візуалізувати зв'язування з епітеліальними клітинами та оцінити антипатогенний ефект. Крім того у *L. rhamnosus* можна експресувати терапевтично активні білки. Наприклад, штам, що експресує білок G (GB1-3), здатний зв'язувати імуноглобуліни та ротавіруси, що зменшує

тяжкість та тривалість діареї. Експресія гена МАМ-7 з *Vibrio parahaemolyticus* сприяла покращенню адгезії, але не інгібувала патогени ефективніше, ніж дикий тип. Успішно експресується антивірусний білок грифїтсин (GRFT) у *L. rhamnosus*, що забезпечує інгібування інфекції ВІЛ-1 *in vitro* [70, 71].

Отже, генетична модифікація *L. rhamnosus* відкриває перспективи створення штамів із цілеспрямованими лікувальними властивостями, зокрема для профілактики або терапії шлунково-кишкових, урогенітальних та вірусних інфекцій.

1.3. Методи виділення та ідентифікації бактерій

У дослідженнях, що стосуються мікроорганізмів з пробіотичним потенціалом, важливе значення має ефективне виділення цільових бактерій та їх точна ідентифікація. З цією метою застосовуються як класичні мікробіологічні методи, так і сучасні молекулярно-генетичні підходи.

Селективні живильні середовища

Одним із основних методів виділення молочнокислих бактерій є використання селективних поживних середовищ. Найбільш поширеним середовищем є MRS-агар (de Man, Rogosa, Sharpe), який забезпечує сприятливі умови для росту представників родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* та *Enterococcus*. Для підвищення селективності до середовища додають антигрибкові агенти, наприклад циклогексимід, з метою пригнічення росту дріжджів і цвілевих грибів. Крім того, для ідентифікації функціональних властивостей застосовуються модифіковані середовища з додаванням специфічних субстратів, наприклад рослинних цукрів (арабіноза, ксилоза, галактоза), які дозволяють оцінити ферментативну активність ізолятів [72].

Селективні поживні середовища відіграють ключову роль у первинному виділенні та попередньому скринінгу молочнокислих бактерій з різних екосистем, зокрема з ферментованої рослинної сировини, молочних продуктів, кишечника людини та тварин. Їх застосування дає змогу пригнічувати ріст супутньої мікрофлори та забезпечувати оптимальні умови для цільових бактерій.

Найбільш широко використовується середовище MRS (de Man, Rogosa, Sharpe), яке спеціально розроблено для культивування *Lactobacillus spp.*. Воно містить джерела азоту (пептони, дріжджовий екстракт), вуглеводи (глюкоза), а також ацетат натрію, який пригнічує ріст багатьох грамнегативних бактерій. Крім того, середовище включає буферну систему (фосфати), солі магнію, марганцю та інші компоненти, необхідні для росту LAB. РН середовища зазвичай регулюють у межах 6,2–6,5 [73].

Окрім класичного MRS, використовуються й інші селективні середовища:

1. Rogosa агар - варіація середовища MRS з пониженим вмістом пептонів і підвищеним вмістом оцтової кислоти; забезпечує кращу селективність щодо *Lactobacillus spp.*

2. M17-агар - оптимізований для вирощування *Lactococcus spp.* і *Streptococcus thermophilus*, часто застосовується у молочній мікробіології.

3. Elliker агар, LBS-агар, ABL-середовище - використовуються для диференціації різних представників молочнокислих бактерій у складних мікробіологічних зразках.

Для пригнічення небажаних мікроорганізмів до селективних середовищ часто додають антибіотики, фунгіциди або інші хімічні сполуки:

- Циклогексимід або ністатин – пригнічують ріст дріжджів та грибів.
- Солі жовчних кислот – для імітації умов тонкого кишечника та відбору стійких до жовчі штамів.

- Антибіотики (наприклад, ванкоміцин, канаміцин) – застосовуються для селекції молочнокислих бактерій, стійких до відповідних речовин [74].

З метою вивчення здатності молочнокислих бактерій до метаболізму рослинних олігосахаридів та моносахаридів застосовують модифіковані середовища MRS або MLS (MRS без глюкози), доповнені окремими вуглеводами як єдиним джерелом вуглецю (наприклад, арабіноза, ксилоза, галактоза, рафіноза, інουλін). Це дозволяє не лише здійснити селекцію штамів, здатних до ферментації цих субстратів, але й виявити перспективні ізоляти для розробки рослинних пробіотичних продуктів [72-75].

Молочнокислі бактерії можна успішно виділити з ферментованої кукурудзи за допомогою модифікованого MRS середовища з додаванням арабінози та ксилози. Такий підхід дозволяє виявити молочнокислі бактерії, здатні до росту в умовах рослинного субстрату, та є релевантним для створення пробіотичних добавок на основі злакової сировини [72].

Таким чином, правильний вибір селективного середовища та його складу є критичним етапом у мікробіологічних дослідженнях, спрямованих на ізоляцію молочнокислих бактерій з природних джерел.

Молекулярні методи ідентифікації

Сучасні дослідження мікробіоти, зокрема вивчення пробіотичних мікроорганізмів, неможливі без застосування молекулярно-генетичних методів, які забезпечують точну та швидку ідентифікацію ізолятів. Вони дозволяють визначити таксономічну належність бактерій, виявити внутрішньовидову варіабельність, встановити філогенетичні зв'язки, а також перевірити наявність або відсутність певних генів, пов'язаних із пробіотичними або патогенними властивостями.

1. Аналіз 16S рРНК є "золотим стандартом" для визначення таксономічної належності бактерій. Цей метод ґрунтується на ампліфікації та секвенуванні консервативної ділянки гена 16S рРНК і дозволяє ідентифікувати бактерії до рівня роду або навіть штаму [76].

Метод ідентифікації бактерій за допомогою секвенування гена 16S рРНК є одним із найбільш поширених і надійних інструментів бактеріальної систематики. Ген 16S рРНК містить як консервативні, так і варіабельні ділянки, що дозволяє ефективно розрізняти бактерії на рівні роду та виду.

Процедура включає:

- екстракцію ДНК,
- ампліфікацію гена 16S рРНК за допомогою ПЛР,
- секвенування та порівняння послідовності з базами даних (наприклад, NCBI BLAST, RDP, SILVA).

Цей метод часто використовується як референтний при перевірці результатів інших способів ідентифікації [76].

2. RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) використовується для порівняння геномного поліморфізму між ізолятами, що дає змогу проводити диференціацію штамів одного виду. Цей метод є швидким і не потребує попереднього знання послідовностей ДНК [77].

RAPD-PCR — це метод, заснований на використанні коротких випадкових праймерів для ампліфікації різних фрагментів ДНК без потреби знання геномної послідовності. Він дозволяє швидко оцінити генетичну подібність між штамми та використовується для штамового типування або "фінгерпрингу" LAB, зокрема *Lactobacillus plantarum*, *L. rhamnosus* тощо [77].

Переваги RAPD-PCR:

- простота і швидкість виконання,
- можливість диференціації штамів одного виду,
- низька вартість аналізу.

Проте до недоліків належать низька відтворюваність та чутливість до умов ПЛР.

3. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) - сучасна технологія, що дозволяє швидко ідентифікувати мікроорганізми за унікальними білковими спектрами. Метод характеризується високою точністю, швидкістю та економічністю при великій кількості зразків. MALDI-TOF дозволяє не лише підтвердити таксономічну належність, а й застосовується для дереплікації - виключення ідентичних ізолятів із подальшого аналізу [78].

MALDI-TOF MS — інноваційний метод ідентифікації мікроорганізмів на основі мас-спектрометричного аналізу білкових профілів (переважно рибосомальних білків). Кожен вид бактерій має унікальний білковий «відбиток», який порівнюється з бібліотеками спектрів у базі даних (наприклад, Bruker Biotyper, VITEK MS).

Переваги MALDI-TOF:

- дуже висока швидкість (результат за декілька хвилин),
- мінімальна підготовка зразка,
- висока точність до рівня виду та навіть штаму,
- низька вартість аналізу при великій кількості зразків [78].

Метод активно застосовується для скринінгу LAB, ідентифікації клінічно значущих мікроорганізмів, дереплікації ізолятів тощо.

Також можуть застосовуватися:

1. Мультиплексна ПЛР – для одночасного виявлення кількох генів (наприклад, генів токсинів або генів толерантності до жовчі).

2. Кількісна ПЛР(qPCR) – для кількісного аналізу присутності специфічних бактеріальних груп у складі мікробіоти.

3. Повногеномне секвенування - метод повного геномного секвенування, який забезпечує найвищу роздільну здатність і дозволяє повністю охарактеризувати функціональний потенціал штаму. Застосовується для високоточних порівнянь пробіотичних ізолятів [79].

Таким чином, молекулярні методи ідентифікації є невід'ємною частиною сучасних мікробіологічних досліджень. Вибір конкретного методу залежить від поставлених завдань, доступного обладнання та необхідного рівня таксономічної точності. Для дослідження пробіотиків доцільно комбінувати методи MALDI-TOF, 16S рРНК-секвенування та RAPD-PCR для забезпечення повноцінної ідентифікації та відбору перспективних штамів. Поєднання традиційних мікробіологічних методів із сучасними молекулярними технологіями дозволяє ефективно здійснювати виділення та ідентифікацію бактерій з пробіотичним потенціалом, забезпечуючи надійність результатів досліджень.

1.4. Критерії пробіотичних штамів

Споживачі потребують продуктів харчування, які можуть бути корисними для них у той чи інший спосіб. З огляду на це, на різних ринках досліджують продукти з пробіотичними мікроорганізмами, намагаючись покращити властивості місцевої мікрофлори [45]. Пробиотики, за їх визначенням, є корисними мікроорганізмами, які позитивно впливають на організм, покращуючи кишкову мікробіоту [26]. Однак важливо зазначити, що всі характеристики, які приписують пробіотикам, загалом залежать від штаму, і окремі штами повинні бути протестовані за кожною властивістю.

Критерії, що використовуються для відбору пробіотиків, були описані різними дослідниками. Для того, щоб мікроорганізм можна було використовувати як пробіотик, він повинен бути переважно людського походження, мати загальноприйнятий статус безпечного і бути здатним виживати в шлунково-кишковому тракті. Найбільш вивченими пробіотиками є молочнокислі бактерії, зокрема лактобактерії та біфідобактерії. Це пояснюється тим, що більшість видів лактобактерій є нормальними мешканцями кишечника людини і тварин, і їхня присутність

важлива для підтримки мікробної екосистеми кишечника. Всі пробіотики, що приймаються перорально, проходять через ротову порожнину і транзитом через шлунково-кишковий тракт, піддаючись під час цієї подорожі численним стресовим факторам, які негативно впливають на їх виживання [45]. Для того, щоб пробіотик колонізував організм хазяїна і мав позитивний вплив на його здоров'я, він повинен володіти більшістю, якщо не всіма, бажаними властивостями. Вони включають, але не обмежуються ними, здатність переносити кислоту і жовчні солі [20, 75], виробляти різноманітні антимікробні сполуки [20], пригнічувати патогени і колонізувати шлунково-кишковий тракт хазяїна [20, 75]. Крім того, пробіотик не повинен містити генів стійкості до антибіотиків, які можуть передаватися. На життєздатність пробіотиків у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту людини впливає кілька факторів, включаючи низьку кислотність шлунка. Повідомлялося, що ці стресові фактори руйнують мембрани бактеріальних клітин, тим самим знижуючи їх життєздатність і здатність проникати через різні клітини [41]. Тому дуже важливо, щоб усі пробіотики були здатні проявляти толерантність до кислоти, щоб забезпечити їх виживання в кислих умовах [42]. Для відбору штамів, що становлять інтерес для пробіотиків, використовуються методи *in vitro*, спрямовані на перевірку їх виживання у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту і прибуття життєздатними до місця дії. Ще однією властивістю, необхідною пробіотикам для виживання в тонкому кишечнику, є толерантність до жовчі [20, 43]. Присутність жовчних солей є бар'єром для виживання мікроорганізмів, що потрапляють в організм під час травлення [32]. Залежно від концентрації жовч може пригнічувати ріст бактерій [44]. Тому здатність пробіотиків переносити жовч була проаналізована шляхом вимірювання росту бактерій у присутності жовчних солей [45, 46, 47]. Толерантність пробіотиків до жовчі означає, що

вони зможуть досягти товстого кишечника, де вони здійснюють свою корисну дію.

Здатність виживати в шлунково-кишковому тракті сама по собі не робить мікроорганізм пробіотиком. Потенційні пробіотичні штами повинні мати здатність прилипати до слизової оболонки кишкового тракту, мати бажану антибіотикорезистентність і чутливість до антибіотиків, бути антагоністичними до потенційно патогенних мікроорганізмів і володіти метаболічною активністю, корисною для здоров'я господаря [28]. Попередні дослідження показали, що більшість молочнокислих бактерій виробляють різноманітні антимікробні сполуки, перебуваючи в різних нішах, таких як шлунково-кишковий тракт [34, 48]. Пробиотичні мікроорганізми повинні бути здатні пригнічувати патогени. Це пригнічення досягається за допомогою різних механізмів, включаючи пригнічення патогенів шляхом конкурентного виключення, вироблення специфічних антимікробних речовин, стимуляцію бар'єрної функції та метаболічної функції [49]. Крім того, було показано, що вони мають інгібуючу активність щодо розмноження кишкових патогенів і демонструють конкурентну здатність через вироблення декількох антимікробних сполук [50]. Пробиотики здатні пригнічувати патогени шляхом адгезії та колонізації в шлунково-кишковому тракті господаря [35]. Ці властивості досліджували у різних видів бактерій у харчових продуктах і в кишковому тракті протягом багатьох років з метою отримання адгезивних пробіотичних бактерій [51].

Останнім часом спостерігається підвищений інтерес до вивчення можливостей пробіотиків у профілактиці та лікуванні різних інфекцій. Це пов'язано з їхньою здатністю перешкоджати зв'язуванню патогенів з епітеліальними клітинами, що було продемонстровано на моделях епітелію кишечника [52]. Одним з механізмів, який пробіотики використовують для пригнічення зв'язування патогенів, є конкурентне виключення, яке раніше

було визначено як широке явище в природі, що включає в себе конкуренцію за поживні речовини [4, 53] і за фізичний простір [55]. Попередні дослідження показали, що конкурентне виключення є основним механізмом пригнічення росту бактерій та грибів. Здатність пробіотичного організму до адгезії до клітин слизової оболонки кишечника вважається важливою для конкурентного виключення ентеропатогенів та імуномодуляції хазяїна відповідно. Розуміння цього механізму конкуренції дозволяє використовувати пробіотичні бактерії для покращення здоров'я, наприклад, для лікування захворювань сечостатевого тракту та ротової порожнини [59].

Здатність пробіотиків відігравати певну роль і приносити користь для здоров'я організму добре вивчена. Пробиотики захищають кишковий бар'єр організму, зміцнюють імунну систему [20] і сприяють виведенню холестерину [20], лікують захворювання, пов'язані із запаленням [20], і полегшують діарею, пов'язану з прийомом антибіотиків [20].

Одним з найважливіших аспектів функціонування пробіотичних бактерій є їхня здатність захищати шлунково-кишкове мікросередовище господаря від вторгнення патогенних мікроорганізмів. Вони досягають цього завдяки підтримці як комменсальних бактерій, так і цілісності кишкового бар'єру [20]. Здатність пробіотиків прикріплюватися до клітин кишечника дає змогу пробіотикам надавати ці корисні ефекти, конкуруючи за простір з іншими мікроорганізмами. Здатність пробіотиків прикріплюватися до клітин кишечника є необхідною умовою для колонізації, стимулювання імунної системи та прояву антагоністичної активності проти ентеропатогенів. Крім того, здатність пробіотика прилипати до поверхні слизової оболонки та колонізувати її дає можливість пробіотику впливати на організм хазяїна [20].

Останнім часом з'являється все більше повідомлень, що підкреслюють значення пробіотиків у шлунково-кишковому тракті для ослаблення

запальних захворювань кишечника [73]. Однак варто також зазначити, що збільшується кількість повідомлень про вплив пробіотиків на імунні реакції за межами шлунково-кишкового тракту, в тому числі на слизову оболонку дихальних шляхів [61, 62]. У людей з ослабленим імунітетом, пробіотики є корисними завдяки своїй здатності модулювати імунну систему (імунобіотики), таким чином представляючи собою привабливий і безпечний спосіб регулювання та посилення імунної функції [62]. Було оцінено вплив різних імунобіотиків на профілактику опортуністичних інфекцій у людей з ослабленим імунітетом, і результати показали, що дієти на основі пробіотиків мають позитивний ефект, оскільки вони значно прискорюють відновлення імунної системи, покращуючи таким чином стійкість до патогенних мікроорганізмів. Види лактобактерій проявляють різні властивості при взаємодії з імунною системою ссавців, включаючи вироблення імуностимулюючих молекул [20].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження та методи виділення *L. rhamnosus*

Виділення бактерій роду *Lactobacillus* проводили із сировини рослинного походження, яку піддавали спонтанній ферментації. Для цього 1 кг зерна кукурудзи було відсортовано та промито проточною водою протягом 30 хв. Після того зерно замочували і стерильній дистильованій воді на 48 годин, потім подрібнювали та просіювали для видалення висівок, оболонки та зародка. Отриману у такий спосіб сировину заливали стерильною дистильованою водою (у співвідношенні 1:1) та залишали для бродіння протягом 24 годин при кімнатній температурі. Після ферментації надлишкову рідину зливали, отриману сировину використовували для виділення молочнокислих бактерій. Зразки зберігали з додаванням гліцерину при температурі -20 оС.

Для виділення молочнокислих бактерій 10 мл ферментованої сировини вносили у 90 мл стерильного розчину пептону та гомогенізували. Після того проводили серійні розведення (від 10^{-1} до 10^{-6}) та 0,1 мл кожного розведення висівали у чашки Петрі на поверхню агаризованих поживних середовищ MRS з додаванням циклогексиміду у концентрації 0,4 г/л для пригнічення розвитку дріжджових мікроорганізмів та цвілевих грибів. До середовища також додавали 1% CaCO_3 для візуалізації кислотопродукуючих бактерій.

Чашки Петрі інкубували в термостаті за температури 37 °С протягом 48 годин. Після того підраховували кількість колоній та загальну кількість життєздатних клітин (КУО/мл) за формулою:

$$\text{Середня кількість колоній мікроорганізмів} = \log_{10} \text{КУО/мл} \div (\text{розведення} \times \text{об'єм, що висівався})$$

Таблиця 2.1.1.

Склад поживного середовища MRS (de Man, Rogosa, Sharpe)

Компонент середовища	Кількість, г/л	Функція
Пептон казеїновий	10,0	Джерело амінокислот і пептидів
Екстракт м'ясний	8,0	Джерело вітамінів групи В, азоту
Екстракт дріжджовий	4,0	Джерело вітамінів і ростових факторів
Глюкоза	20,0	Джерело карбону
Калій фосфат двозаміщений KH_2PO_4	2,0	Буферна система
Натрій ацетат CH_3COONa	5,0	Селективний агент, пригнічує небажу мікрофлору
Магній сульфат $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	Джерело іонів Mg^{2+}
Манган сульфат $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05	Джерело іонів Mn^{2+} , кофактор ферментів
Амоній цитрат $\text{CH}_3\text{COONH}_4$	2,0	Альтернативне джерело азоту
Tween 80	1,0 мл	Стабілізатор мембран, джерело жирних кислот
Агар	15	Загушувач
pH середовища	6,2–6,5 (регулюється перед автоклавуванням)	Оптимум для молочнокислих бактерій

Колонії відбирали переважно за морфологічними ознаками (розміром, кольором та формою), повторно пересівали методом виснажуючого штриха та культивували на поживному середовищі MRS для отримання чистих культур. Кислотопродукуючі колонії ідентифікували за наявністю прозорої зони навколо колонії.

2.2. Фенотипова ідентифікація штамів лактобактерій

Після отримання чистих культур з кожної чашки Петрі було відібрано від 6 до 8 колоній, які надалі пересівали на агаризоване поживне середовище MRS для подальших досліджень, зокрема, вивчення морфологічних характеристик, фарбування за Грамом, біохімічним тестам (тест на каталазу, оксидазний тест) для первинної ідентифікації. Ізоляти, які мали форму паличок, були грампозитивними та каталазонегативними, попередньо ідентифікували як представників роду *Lactobacillus*. Отримані ізоляти зберігали при температурі 4 °C на скошеному поживному середовищі MRS.

Фарбування за Грамом. Визначення типу клітинної стінки проводили за допомогою набору для фарбування за Грамом за протоколом. Готували мазки з добових культур, фіксували термічно над полум'ям пальника, наносили розчин кристалічного фіолетового і витримували 2-3 хв. Далі наносили розчин Люголя, витримували 2-3 хв і змивали спочатку водою, а потім проводили деколоризацію розчином етанолу. Контрастували клітини розчином фуксину. Знову промивали водою, висушували зразки та роздивлялися в полі зору оптичного мікроскопу на збільшенні $\times 90$ з використанням імерсійної олії.

Отримані ізоляти бактерій було охарактеризовано також за кольором, формою, висотою, прозорістю, краєм утворених колоній.

Каталазний тест. Активність каталази визначали за продукцією O_2 після додавання краплі (1 мл) 1,5% H_2O_2 до молоді колонії, що росла на агаризованому середовищі YEM. Через 5 хвилин спостерігали утворення пухирців O_2 , що ілюструє позитивну реакцію на каталазу, відповідно, негативною реакцією вважалась відсутність пухирців O_2 після нанесення H_2O_2 на колонію мікроорганізмів.

Оксидазний тест (тест на виявлення цитохромоксидази).

Цитохромоксидазну активність визначали за допомогою дисків, просочених N,N-диметил-*p*-фенілендіаміном (Sigma-Aldrich). Для проведення тесту кожен диск змочували чотирма інокуляційними петлями стерильної дистильованої води. За допомогою інокуляційної петлі асептично переносили мікроорганізми з поверхні агаризованого середовища на змочений водою диск. Після того спостерігали за диском протягом декількох хвилин: якщо ділянка диска, на яку було нанесено мікроорганізми, ставала забарвлена від темно-синього до темно-бордового, реакція позитивна, якщо протягом трьох хвилин зміна кольору не відбувалась, реакція негативна.

2.3. Оцінка пробіотичних властивостей штамів *L. rhamnosus*

Оцінка толерантності до низького рН та високих концентрацій жовчних солей

Оцінку толерантності до низького рН та високої концентрації жовчних солей проводили шляхом інкубації бактеріальних культур у рідкому поживному середовищі MRS при температурі 37 °C протягом 24 год. Після інкубації суспензії бактеріальних культур центрифунували (2000 g, протягом 15 хв), осад двічі промивали фосфатним буфером і ресуспендували у фосфатному буфері (рН 2,5) та рідкому середовищі MRS з 0,3% жовчних солей (натрій холату та натрій дезоксихолату) та 0,2% тіогліколяту натрію. Після інкубації протягом 3 годин при температурі 37C життєздатність бактеріальних клітин оцінювали методом висіву на поверхню агаризованого середовища MRS у чашки Петрі та підрахунок колоній у порівнянні з контролем (0 та 3 години інкубації у фосфатному буфері). Експеримент проводили у 3 повторностях.

Оцінка антимікробної активності

Антимікробну активність визначали методом дифузії в агар з використанням тест культур мікроорганізмів *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Для дослідження використовували нічну культуру виділених ізолятів, які культивували у рідкому середовищі MRS при 37 °С. Культуральну рідину центрифугували при 14 000 g, протягом 10 хв, фільтрували через мембранний фільтр з діаметром пор 0,2 мкм. Після того 50 мкл фільтрату вносили у лунки діаметром 5 мм в агаризованому поживному середовищі на чашках Петрі, яке було попередньо засіяно тест-культурами. Після інкубації протягом 24 год при температурі 37 °С спостерігали наявність зон пригнічення росту, що свідчило про антимікробну активність досліджуваних ізолятів.

Оцінка чутливості до антибіотиків

Чутливість до антибіотиків визначали методом паперових дисків. В якості тестових антибіотиків використовували: тетрациклін (30 мкг), гентаміцин (10 мкг), кліндаміцин (2 мкг) та ванкоміцин (30 мкг). Виділені ізоляти висівали на агаризоване середовище MRS, після того на поверхню середовища поміщали диски з відповідними антибіотиками. Чашки Петрі інкубували протягом 24 годин при температурі 37 °С. Після інкубації вимірювали діаметр зони затримки росту та визначали ступінь чутливості отриманих ізолятів бактерій: чутливі, проміжні, стійкі.

Стійкість до умов травної системи людини (моделювання in vitro)

Для визначення стійкості отриманих ізолятів до умов травної системи людини до суспензії ізолятів бактеріальних культур додавали 5% пепсину, доводили рН до 3,0 та інкубували протягом 120 хв за умов помірного струшування (фаза 1). Після того до зразків додавали 0,3%

жовчних солей, 0,1% панкреатину, доводили рН до 6,0 та інкубували 180 хв (фаза 2). До та після кожної фази проводили відбір проби бактеріальної культури, здійснювали серійне розведення та висівали на поверхню агаризованого поживного середовища MRS. Чашки Петрі інкубували протягом 48 годин за температури 37 °С.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виділення, кількісна та фенотипова характеристика *L. rhamnosus*

В результаті проведенні досліджень по виділенню бактеріальних культур із ферментованого зерна кукурудзи було отримано 34 ізоляти молочнокислих бактерій. Колонії отриманих ізолятів за морфологічними параметрами відрізнялись напівсферичною формою, мали кремове, біле або жовте забарвлення. Отримані колонії були дрібними, гладкими, із зернистою поверхнею, плоскі або припідняті за рельєфом, прозорі або напівпрозорі. Кількість виділених мікроорганізмів складала $7,59 \times 10^6$ КУО/мл, що є достатньо високим показником життєдіяльності при виділенні бактерій із ферментованих рослинних субстратів.

Виділені ізоляти було проаналізовано за біохімічними та морфологічними ознаками. Серед досліджуваних ізолятів 12 виявились грампозитивними, паличкоподібними або кулястими за формою, каталазо- та оксидазонегативними бактеріями. Крім того, ці 12 ізолятів бактерій утворювали чіткі світлі зони навколо колоній на середовищі MRS, доповненому 1% CaCO_3 , що свідчить про їхню здатність продукувати органічні кислоти. По відношенню до температури отримані ізоляти бактерій виявились мезофільними, оскільки оптимум температури виявився в межах 30-37 °C. Крім того, культури проявляли здатність рости в умовах підвищеної осмолярності (за наявності 2,5-5% NaCl у поживному середовищі). Зазначені особливості характерні для молочнокислих бактерій, зокрема, представників роду *Lactobacillus*, що дозволяє попередньо ідентифікувати дані мікроорганізми як *Lactobacillus sp.*, причому 4 з 12 найбільш ймовірно є *L. rhamnosus* (табл. 3.1.1.).

Таблиця 3.1.1.

Морфологічні та біохімічні характеристики ізолятів *Lactobacillus sp.*,

Шифр ізоляту	Розмір та форма колонії	Рельєф колонії	Край колонії	Прозорість колонії	Колір колонії	Тип клітинної стінки за Грамом	Каталазний тест	Оксидазний тест	Ймовірна ідентифікація
Lr1/24	дрібні, округлі	підняті	цілісний	непрозорі	білий	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Lr2/24	середні, округлі	плоска	цілісний	прозорі	кремова	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Lr3/24	дрібні, округлі	підняті	цілісний	непрозорі	білий	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Lr4/24	крупні, округлі	опуклі	цілісний	прозорі	кремовий	+	-	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Lr5/24	середня, кругла	опукла	хвиляста	прозора	кремова	+	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Lr6/24	мала, неправильна	плоска	зубчаста	непрозора	жовтувата	+	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>
Lr7/24	велика, кругла	піднята	цілісна	прозора	білувата	+	-	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lr8/24	середня, кругла	опукла	цілісна	прозора	кремова	+	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>
Lr9/24	мала, кругла	плоска	цілісна	непрозора	жовтувата	+	-	-	<i>Lactobacillus fermentum</i>
Lr10/24	середня, овальна	опукла	зубчаста	прозора	кремова	+	-	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Lr11/24	мала, кругла	плоска	хвиляста	непрозора	кремова	+	-	-	<i>Lactobacillus salivarius</i>
Lr12/24	велика, кругла	піднята	цілісна	прозора	білувата	+	-	-	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Таким чином, з спонтанно ферментованої рослинної сировини є можливим виділення молочнокислих бактерій, зокрема, роду *Lactobacillus*. Подібні дослідження проводились з використанням в якості субстрату фуру, вару, ноно, пальмове вино, огі, ферментовану кукурудзу [80-82]. Причому, варто зазначити, що представники роду *Lactobacillus* є домінуючими при ферментації продуктів рослинного походження [83, 84].

Крім того, бактерії роду *Lactobacillus* мають велике економічне значення, оскільки мають статус безпечних мікроорганізмів та використовуються як закваски у харчовій промисловості та в якості пробіотиків [84, 85].

3.2. Оцінка пробіотичних властивостей штамів *L. rhamnosus*.

Оцінка толерантності до низького рН та високих концентрацій жовчних солей

Більшість пробіотичних бактерій надходить до організму людини із продуктами харчування. Тому такі бактерії повинні бути толерантними до умов шлунково-кишкового тракту людини, а саме повинні витримувати мінімум 90 хв впливу низького рівня рН шлункового соку та жовчних солей у тонкому кишечнику людини. Такі умови є захисними реакціями організму людини від патогенних мікроорганізмів, тому пробіотичні мікроорганізми повинні бути до них толерантними, щоб ефективно колонізувати шлунково-кишковий тракт людини та здійснювати свою біологічну активність. Тому наступним етапом наших досліджень було визначити, чи є отримані 4 ізоляти *L. rhamnosus* стійкими до низького рН та жовчних кислот.

Результати досліджень показали, що всі досліджувані ізоляти демонструють достатньо високу виживаність за умов низького рН та 0,3% жовчних солей. Так, ізоляти Lr1/24 та Lr4/24 після 3-годинної інкубації мають найвищу виживаність, яка складала 87 та 92 % відповідно. В той же час, ізоляти Lr2/24 та Lr3/24 показали дещо нижчу виживаність за досліджуваних умов — 77 та 82 % відповідно, проте ці показники також є достатньо високими для пробіотичних мікроорганізмів. Кількісні показники виживаності ізолятів *L. rhamnosus* наведено в таблиці 3.2.2.

Таблиця 3.2.2.

Показники виживаності ізолятів *L. rhamnosus* після інкубації протягом 3 годин при рН 2,5 та присутності 0,3 % жовчних солей.

Код ізоляту	Кінцева кількість клітин (КУО/мл) після інкубації при рН 2,5	Кінцева кількість клітин (КУО/мл) після інкубації в присутності 0,3% жовчних солей
Lr1/24	9,38±0,04	7,22±0,01
Lr2/24	8,77±0,03	6,00±0,04
Lr3/24	9,07±0,04	5,44±0,05
Lr4/24	10,2±0,04	7,19±0,03

Таким чином, отримані ізоляти *L. rhamnosus* показали високу толерантність до низького рН та жовчних солей, що свідчить про їхню здатність виживати в умовах шлунково-кишкового тракту людини. Найвищу виживаність показали ізоляти Lr1/24 та Lr4/24, що підтверджує їхній потенціал як ефективних пробіотичних штамів.

Визначення антимікробної активності отриманих ізолятів L. rhamnosus

Однією з особливостей пробіотичних мікроорганізмів є здатність пригнічувати патогенні та умовнопатогенні мікроорганізми. В даному дослідженні аналізували здатність виділених ізолятів до пригнічення росту бактерій *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Ступінь антимікробної активності визначали за такими критеріями: високоефективні - ≥ 20 мм, помірноактивні — від 10 до 20 мм, низькоефективні - ≤ 10 мм.

Результати досліджень показали, що ізолят Lr3/24 не виявив антимікробної активності проти досліджуваних мікроорганізмів. В той же час ізоляти Lr1/24, Lr2/24 та Lr4/24 проявили високу та помірну активність. Найбільш активним виявився ізолят Lr4/24 – зона затримки росту для *E. coli* становило 35 мм, а для *S. aureus* – 28 мм.

Таким чином, ізоляти *L. rhamnosus* проявили різний ступінь антимікробної активності щодо *E. coli* та *S. aureus*. Найбільшу активність виявив ізолят Lr4/24, що свідчить про його високий потенціал в якості пробіотичного мікроорганізму із вираженою антагоністичною активністю.

Оцінка чутливості ізолятів *L. rhamnosus* до антибіотиків.

Результати дослідження чутливості отриманих ізолятів *L. rhamnosus* до антибіотиків тетрацикліну, кліндаміцину, ванкоміцину, гентаміцину показали, що ізоляти демонструють варіабільність у чутливості до зазначених антибіотиків залежно від ізоляту та антимікробного препарату (табл.3.2.3).

Таблиця 3.2.3.

Чутливість ізолятів *L. rhamnosus* до антибіотиків

Ізолят	Тетрациклін	Кліндаміцин	Ванкоміцин	Гентаміцин
Lr1/24	чутливий	Помірно чутливий	чутливий	чутливий
Lr2/24	чутливий	чутливий	чутливий	Помірно чутливий
Lr3/24	резистентний	резистентний	резистентний	резистентний
Lr4/24	резистентний	Помірно чутливий	резистентний	резистентний

Варто зазначити, що ізолят Lr1/24 показав високу чутливість до всіх досліджуваних антибіотиків, окрім кліндаміцину, до якого спостерігалась помірна чутливість. Подібні результати отримано для ізоляту Lr2/24, який був чутливим до тетрацикліну, кліндаміцину та ванкоміцину, проте мав помірну чутливість до гентаміцину. Разом з тим, ізоляти Lr3/24 та Lr4/24 виявили стійкість до більшості антибіотиків. Ізолят Lr3/24 був резистентним до всіх протестованих препаратів, що свідчить про наявність множинної лікарської стійкості. В той же час, штам Lr4/24 проявив

резистентність до тетрацикліну, ванкоміцину та гентаміцину, а до кліндаміцину характеризувався помірною чутливістю.

Отже, чутливість ізолятів *L. rhamnosus* до антибіотиків була штамо залежною. Виявлення високого рівня резистентності у деяких ізолятів, зокрема, Lr3/24 та Lr4/24, підкреслює необхідність ретельної оцінки безпеки потенційних пробіотичних штамів, особливо з огляду на можливість горизонтального переносу генів резистентності до патогенних мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ

Проведені дослідження дозволяють зробити наступні висновки:

1. Показано, що отримані 12 з 34 ізолятів з ферментованого зерна кукурудзи попередньо ідентифіковані як представники роду *Lactobacillus*, з них 4 ізоляти, ймовірно, належать до виду *L. rhamnosus*. Виявлені біохімічні та морфологічні ознаки підтверджують їх здатність до кислотоутворення, мезофільну природу та толерантність до підвищеної осмолярності.
2. Визначено, що отримані ізоляти *L. rhamnosus* мають високу толерантність до низького рН та жовчних солей, що свідчить про їхню здатність виживати в умовах шлунково-кишкового тракту людини та робить їх перспективними штамми для створення пробіотичних препаратів.
3. Показано, що ізоляти *L. rhamnosus* проявили різний ступінь антимікробної активності щодо *E. coli* та *S. aureus*. Найбільшу активність виявив ізолят Lr4/24, що свідчить про його високий потенціал в якості пробіотичного мікроорганізму із вираженою антагоністичною активністю.
4. Виявлено, що високий рівень резистентності до антибіотиків тетрацикліну, кліндаміцину, ванкоміцину, гентаміцину мають ізоляти *L. rhamnosus* Lr3/24 та Lr4/24, що підкреслює необхідність ретельної оцінки безпеки потенційних пробіотичних штамів, особливо з огляду на можливість горизонтального переносу генів резистентності до патогенних мікроорганізмів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sghir, A., Gramet, G., Suau, A. та ін. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66. – P. 2263–2266.
2. Guarner, F., Malagelada, J.R. Gut flora in health and disease // *The Lancet*. – 2003. – Vol. 361. – P. 512–519.
3. Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P. та ін. Probiotics: effects on immunity // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2001. – Vol. 73. – P. 444S–450S.
4. Kim, Y., Kim, S.H., Whang, K.Y. та ін. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 18. – P. 1278–1285.
5. Suvarna, V.C., Bobby, V.U. Probiotics in human health: a current assessment // *Current Science*. – 2005. – Vol. 88. – P. 1744–1748.
6. Reid, G., Kim, S.O., Kohler, G.A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 46. – P. 149–157.
7. van Belkum, A., Nieuwenhuis, E.E. Life in commercial probiotics // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2007. – Vol. 50. – P. 281–283.
8. Winkler, P., Ghadimi, D., Schrezenmeir, J. та ін. Molecular and cellular basis of microflora–host interactions // *The Journal of Nutrition*. – 2007. – Vol. 137. – P. 756S–772S.
9. García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A. та ін. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine // *Food Microbiology*. – 2014. – Vol. 44. – P. 220–225.

10. Vidhyasagar, V., Jeevaratnam, K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro // *Journal of Functional Foods*. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 235–243.

11. Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages // *Food Microbiology*. – 2014. – Vol. 38. – P. 303–311.

12. Kozak, K., Charbonneau, D., Sanozky-Dawes, R., Klaenhammer, T. Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breast milk and their infants // *Gut Microbes*. – 2015. – Vol. 6, № 6. – P. 341–351.

13. Ciandrini, E., Campana, R., Casettari, L. та ін. Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral streptococci biofilm // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 100. – P. 6767–6777.

14. Davoodabadi, A., Dallal, M. M. S., Lashani, E., Ebrahimi, M. T. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli* // *Jundishapur Journal of Microbiology*. – 2015. – Vol. 8, № 12. – Article e27852.

15. Halimi, S., Mirsalehian, A. Assessment and comparison of probiotic potential of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants // *Microbiology and Immunology*. – 2016. – Vol. 60, № 2. – P. 73–81.

16. Lavilla-Lerma, L., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses // *International Journal of Food Microbiology*. – 2013. – Vol. 163, № 2. – P. 136–145.

17. De Dea Lindner, J., Santarelli, M., Tiemi Yamaguishi, C., Soccol, C. R., Neviani, E. Recovery and identification of bovine colostrum microflora

using traditional and molecular approaches // *Food Technology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 49. – P. 364–368.

18. Haghshenas, B., Nami, Y., Haghshenas, M., Abdullah, N., Rosli, R., Radiah, D., Khosroushahi, A. Y. Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products // *MicrobiologyOpen*. – 2015. – Vol. 4, № 5. – P. 803–813.

19. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S. та ін. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2014. – Vol. 11. – P. 506–514.

20. Alshammari, E., Patel, M., Sachidanandan, M., Kumar, P., Adnan, M. Potential evaluation and health fostering intrinsic traits of novel probiotic strain *Enterococcus durans* F3 isolated from the gut of fresh water fish *Catla catla* // *Food Science of Animal Resources*. – 2019. – Vol. 39. – P. 844–861.

21. Mishra, S., Acharya, S. A brief overview on probiotics: The health friendly microbes // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2021. – Vol. 14. – P. 1869–2285.

22. Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., Ouwenhand, A. C. Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – Article 1662.

23. Touret, T. M. M. Isolation and characterization of microorganisms with probiotic potential : Master's thesis / T. M. M. Touret ; Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal. – Lisboa, 2016. – 103 c.

24. Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G. V. Probiotics and

health: An evidence-based review // *Pharmacological Research*. – 2011. – Vol. 63, № 5. – P. 366–376.

25. Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus // *International Journal of Food Microbiology*. – 2008. – Vol. 126, № 3. – P. 278–285.

26. FAO/WHO. Probiotics in food – Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. – Food and Nutrition Paper. – 2001. – № 85.

27. Kumar, N., Rai, A. K., Tomar, S. K. A comprehensive review of the characterization, host interactions, and safety of probiotic microorganisms // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2024. – Vol. 23, № 2. – P. 1535–1567.

28. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J. та ін. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020. – Vol. 70. – P. 2782–2858.

29. Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial // *The Lancet*. – 2001. – Vol. 357. – P. 1076–1079.

30. Moslem, P., Hossein, N., Mahdi, R., Seyed, N. H., Seyed, A. S. *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): A top well-researched probiotic strain // *Journal of Medical Microbiology*. – 2017. – Vol. 5. – P. 46–59.

31. De Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., Forestier, C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LCR35, after oral consumption // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41. – P. 1270–1273.

32. Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: In vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties // *Research in Microbiology*. – 2001. – Vol. 152. – P. 167–173.

33. Doron, S., Snyderman, D. R., Gorbach, S. L. *Lactobacillus GG*: Bacteriology and clinical applications // *Gastroenterology Clinics of North America*. – 2005. – Vol. 34. – P. 483–498.

34. Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 1999. – Vol. 26. – P. 137–142.

35. Martín, R., Chamignon, C., Mhedbi-Hajri, N., Chain, F., Derrien, M., Escribano-Vázquez, U., Garault, P., Cotillard, A., Pham, H. P., Chervaux, C. та ін. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects the intestinal barrier by stimulating both mucus production and cytoprotective response // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – Article 5398.

36. Segers, M. E., Lebeer, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – Vol. 13. – Article 7.

37. Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – Vol. 276. – P. 140–148.

38. Marianelli, C., Cifani, N., Pasquali, P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions // *Research in Microbiology*. – 2010. – Vol. 161. – P. 673–680.

39. Zhang, Z. G., Ye, Z. Q., Yu, L., Shi, P. Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: An update // *BMC Evolutionary Biology*. – 2011. – Vol. 11. – Article 1.

40. Szajewska, H., Wanke, M., Patro, B. Meta-analysis: The effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhoea in children // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. – 2011. – Vol. 34. – P. 1079–1087.
41. Allonsius, C. N., van den Broek, M. F. L., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E. F. M., Kiekens, F., Foubert, K., Vandenheuvel, D., Cos, P., Delputte, P. та ін. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides // *Microbial Biotechnology*. – 2017. – Vol. 10. – P. 1753–1763.
42. Slykerman, R. F., Hood, F., Wickens, K., Thompson, J. M. D., Barthow, C., Murphy, R., Kang, J., Rowden, J., Stone, P., Crane, J. та ін. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: A randomised double-blind placebo-controlled trial // *EBioMedicine*. – 2017. – Vol. 24. – P. 159–165.
43. Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., Savijoki, K., Nyman, T. A., Surakka, A., Salusjärvi, T. та ін. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2011. – Vol. 10. – Suppl. 1. – P. S1–S18.
44. Guarino, A., Vecchio, A. L., Canani, R. B. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea // *Current Opinion in Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 25. – P. 18–23.
45. Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Romaniello, R., Sorrentino, E., Coppola, R. Pre-cultivation with selected prebiotics enhances the survival and the stress response of *Lactobacillus rhamnosus* strains in simulated gastrointestinal transit // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – Article 1067.
46. Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., Coppola, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*,

- Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract // LWT – Food Science and Technology. – 2015. – Vol. 60. – P. 721–728.
47. Pace, F., Pace, M., Quartarone, G. Probiotics in digestive diseases: Focus on *Lactobacillus GG* // Minerva Gastroenterologica e Dietologica. – 2015. – Vol. 61. – P. 273–292.
48. de Alcântara, A. L. D. A., Bruzaroski, S. R., Luiz, L. L., de Souza, C. H. B., Poli-Frederico, R. C., Fagnani, R., de Santana, E. H. W. Antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* against *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* from raw milk // Journal of Food Processing and Preservation. – 2019. – Vol. 43. – Article e14082.
49. Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* // Food Control. – 2016. – Vol. 62. – P. 44–51.
50. Jeong, Y. J., Moon, G. S. Antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 presenting a narrow antimicrobial spectrum // Korean Journal for Food Science of Animal Resources. – 2015. – Vol. 35. – P. 137.
51. Biswas, S., Keightley, A., Biswas, I. Characterization of a stress tolerance-defective mutant of *Lactobacillus rhamnosus* LRB // Molecular Oral Microbiology. – 2019. – Vol. 34. – P. 153–167.
52. Patel, M., Siddiqui, A. J., Hamadou, W. S., Surti, M., Awadelkareem, A. M., Ashraf, S. A., Alreshidi, M., Snoussi, M., Rizvi, S. M., Bardakci, F. та ін. Inhibition of bacterial adhesion and antibiofilm activities of a glycolipid biosurfactant from *Lactobacillus rhamnosus* with its physicochemical and functional properties // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10. – Article 1546.
53. Naik, A. K., Pandey, U., Mukherjee, R., Mukhopadhyay, S., Chakraborty, S., Ghosh, A., Aich, P. *Lactobacillus rhamnosus* GG reverses mortality of

neonatal mice against *Salmonella* challenge // Toxicology Research. – 2019. – Vol. 8. – P. 361–372.

54. Orlando, A., Linsalata, M., D'Attoma, B., Russo, F. Changes in paracellular permeability induced by Pepsin-Trypsin digested Gliadin (PTG): Role of polyamines in the *Lactobacillus rhamnosus* GG protective action // Journal of Functional Foods. – 2017. – Vol. 36. – P. 52–62.

55. von Ossowski, I., Reunanen, J., Satokari, R., Vesterlund, S., Kankainen, M., Huhtinen, H., Tynkkynen, S., Salminen, S., de Vos, W. M., Palva, A. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76. – P. 2049–2057.

56. Shi, T., Aryantini, N. P. D., Urashima, T., Fukuda, K., Nishiyama, K., Nakamata, K., Yamamoto, Y., Mukai, T., Mikumo, D., Oda, Y. та ил. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains from traditional fermented mare milk produced in Sumbawa Island of Indonesia // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2012. – Vol. 76. – P. 1897–1903.

57. Han, X., Lee, A., Huang, S., Gao, J., Spence, J. R., Owyang, C. *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents epithelial barrier dysfunction induced by interferon-gamma and fecal supernatants from irritable bowel syndrome patients in human intestinal enteroids and colonoids // Gut Microbes. – 2019. – Vol. 10. – P. 59–76.

58. Herrera, M., Salva, S., Villena, J., Barbieri, N., Alvarez, S. *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 enhances systemic and respiratory innate immune response in immunocompromised malnourished mice // Journal of Functional Foods. – 2013. – Vol. 5. – P. 1693–1704.

59. Vargas García, C. E., Petrova, M., Claes, I. J., De Boeck, I., Verhoeven, T. L., Dilissen, E., von Ossowski, I., Palva, A., Bullens, D. M., Vanderleyden, J. та ил. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis

and cytokine modulation in macrophages // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – Vol. 81. – P. 2050–2062.

60. Dimitrijevic, R., Petrusic, V., Zivkovic, I., Dimitrijevic, L., Ivanovic, N., Djordjevic, B., Mathiesen, G. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* LA68 on the immune system of C57BL/6 mice upon oral administration // Journal of Dairy Research. – 2014. – Vol. 81. – P. 202–207.

61. Goldenberg, J. Z., Lytvyn, L., Steurich, J., Parkin, P., Mahant, S., Johnston, B. C. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2015. – Issue 12. – Article CD004827.

62. Arnbjerg, C. J., Vestad, B., Hov, J. R., Pedersen, K. K., Jespersen, S., Johannesen, H. H., Holm, K., Halvorsen, B., Fallentin, E., Hansen, A. E. та ін. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation on intestinal inflammation assessed by PET/MRI scans and gut microbiota composition in HIV-infected individuals // Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2018. – Vol. 78. – P. 450–457.

63. Ishimwe, N., Daliri, E. B., Lee, B. H., Fang, F., Du, G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics // Molecular Nutrition & Food Research. – 2015. – Vol. 59. – P. 94–105.

64. Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., Holzapfel, W. H. Safety Assessment of Starters and Probiotics // In: Fermentation and Food Safety. – Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers, 2000. – P. 239–252.

65. Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A., Kołożyn-Krajewska, D. Trends and possibilities of the use of probiotics in food production // In: Alternative and Replacement Foods. – Cambridge, MA, USA: Academic Press, 2018. – P. 65–94.

66. Mitra, S., Ghosh, B. C. Quality characteristics of kefir as a carrier for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG // International Journal of Dairy Technology. – 2020. – Vol. 73. – P. 384–391.

67. Salimei, E., Capilongo, V., Simoni, A., Peiretti, P. G., Maglieri, C., Romano, C. A., Mannina, L., Coppola, R., Sorrentino, E. *Lactobacillus rhamnosus* as additive for maize and sorghum ensiling // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55. – P. 9600–9607.
68. Kiekens, S., Vandenheuvel, D., Broeckx, G. C. I., Allonsius, C., De Boeck, I., Thys, S., Timmermans, J. P., Kiekens, F., Lebeer, S. Impact of spray-drying on the pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG // Microbial Biotechnology. – 2019. – Vol. 12. – P. 849–855.
69. Kailasapathy, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications // Current Issues in Intestinal Microbiology. – 2002. – Vol. 3. – P. 39–48.
70. Mathipa, M. G., Thantsha, M. S. Probiotic engineering: Towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens // Gut Pathogens. – 2017. – Vol. 9. – Article 28.
71. Kumar, M., Yadav, A. K., Verma, V., Singh, B., Mal, G., Nagpal, R., Hemalatha, R. Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: An overview of potential prospects // Future Microbiology. – 2016. – Vol. 11. – P. 585–600.
72. Zhang, Q. et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from fermented corn-based products // Foods. – 2021. – Vol. 10, № 2. – Article 335.
73. de Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // Journal of Applied Bacteriology. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
74. Bernbom, N. et al.. Antimicrobial and antifungal activity of LAB used for inhibition of common food spoilage and pathogenic microorganisms // International Journal of Food Microbiology. – 2020. – Vol. 314. – Article 108391.

75. Huang, Y., Adams, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance and probiotic properties of selected lactic acid bacteria // *International Journal of Food Microbiology*. – 2022. – Vol. 356. – Article 109357.
76. Kumar, N., Rai, A. K., Tomar, S. K. A comprehensive review of the characterization, host interactions, and safety of probiotic microorganisms // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2024. – Vol. 23, № 2. – P. 1535–1567.
77. Ben Amor, K. та ін. Design and evaluation of strain-specific PCR primers for rapid identification of *Lactobacillus plantarum* // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2007. – Vol. 30, № 8. – P. 635–644.
78. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – Article 791.
79. Sun, Z. та ін. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Lactobacillus* reveals their functional diversity // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2015. – Vol. 65, № 3. – P. 1290–1299.
80. David, A. A., Orukotan, A. A., Mohammed, S. S. Conventional and molecular characterization of selected lactic acid bacteria from fermented corn gruel (ogi) and fermented milk (Nono) // *Science World Journal*. – 2019. – Vol. 14, № 4.
81. Arimah, B. D., Ogunlowo, O. P., Adebayo, M. A., Jesumirhewe, C. Identification of lactic acid bacteria isolated from selected Nigerian foods and comparison of their bacteriocins activities // *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 20–26.
82. Nkemnaso O.C. Enzymatic potentials of lactic acid bacteria isolated from palm wine // *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*. – 2018. – Vol. 4. – P. 4.

83. Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus strains* from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis // Food Microbiology. – 2014. – Vol. 38. – P. 240–249.
84. Huang, Y., Adams, M. C. Isolation and characterization of potentially probiotic bacteria from plant-based fermented foods // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 133, №. 2. – P. 739–752.
85. ManasRanjan, S. M., Ramesh, C. R., Rizwana Parveen, R. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics // Biotechnology Research International. – 2014.