ВИВЧЕННЯ ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕНТЕРОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ КАРПАТСЬКОЇ БРИНЗИ

І. І. Кушнір, аспірант¹

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С. З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 70010, Україна
irynakushn@gmail.com

У статті наведено результати досліджень із вивчення патогенних властивостей ентерококів, виділених із карпатської бринзи. Ентерококи, завдяки високій ферментативній активності, надають унікальних смакових властивостей продуктам харчування. Проте, у науковців ставлення до них неоднозначне, в першу чергу, через набуття цими мікроорганізмами резистентності до антимікробних препаратів, та здатності окремих видів спричиняти різні захворювання у людей та тварин.

При дослідженні інфекційності встановили, що за внутрішньошлункового введення живих ентерококів у дозі 10^8 КУО на тварину, а при дослідженні токсичності – інактивованих мікроорганізмів, білі миші залишалися живими. Упродовж 14-добового періоду спостереження лабораторні тварини були активними, мали задовільний апетит, зберігали рефлексорну збудливість на звукові та світлові подразники. Тому, досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB 12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 не інфекційні та не токсичні, оскільки не спричиняли будь-яких клінічних симптомів і відхилень в загальному стані білих мишей.

У досліджуваних штамів ентерококів відсутні ферменти, що відносяться до факторів патогенності, зокрема, вони не володіли каталазою активністю, яка властива патогенним аеробним та факультативно-анаеробним мікроорганізмам, не продукували лецитинази, яка викликає деполімеризацію мембран клітин макроорганізму. Крім того, досліджувані мікроорганізми не продукували плазмокоагулазу та фібринолізин, що вказує на апатогенні властивості досліджуваних мікроорганізмів.

Застосування досліджуваних штамів ентерококів не викликало подразнювальної дії на слизову оболонку ока. При визначенні гострої токсичності було встановлено, що внутрішньошлункове застосування досліджуваних штамів не викликало ознак гострого отруєння, загибелі та захворювань лабораторних тварин. При цьому, упродовж 14-добового періоду спостереження, у тварин не було виявлено будь-яких змін клінічного стану.

За тривалого застосування ентерококів, упродовж 28 діб, змін у клінічному стані лабораторних тварин також не виявляли, однак спостерігали зростання маси тіла тварин. Зокрема, на 28 добу експерименту відзначали зростання маси тіла тварин, яким застосовували штами *E. durans* SB6, *E. faecium* SB 12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, відповідно, на – 7,7, 7,5, 7,32 та 10,2 %, порівняно до показників величин тварин контрольної групи.

Ключові слова: ЕНТЕРОКОКИ, ПАТОГЕННІСТЬ, ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, ПОДРАЗНЮЮЧА ДІЯ.

¹Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук О. Й. Цісарик

THE STUDY OF PATHOGENIC PROPERTIES OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM THE CARPATHIAN CHEESE

I. I. Kushnir

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies
named after Stepan Gzhytskyi,
50, Pekarska str., Lviv, 70010, Ukraine
irynakushn@gmail.com

The article presents the results of the studies of pathogenic properties of enterococci isolated from the Carpathian brynza. Due to the high enzymatic activity, enterococci give food unique taste properties. However, scientists have an ambiguous attitude to them, primarily due to the acquisition of resistance to antimicrobials by these microorganisms, and the ability of certain species to cause various diseases in humans and animals.

In the determining of infectivity, it was found that the intra-gastric administration of live enterococci at a dose of 10^8 CFU per animal, and in the study of toxicity - inactivated microorganisms, white mice remained alive. During the 14-day observation period, the laboratory animals were active, had a satisfactory appetite, and maintained reflex excitability for sound and light stimulus. Therefore, the studied strains of enterococci *E. durans* SB6, *E. faecium* SB 12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 are not infectious and non-toxic, as they did not cause any clinical symptoms and abnormalities in the overall condition of white mice.

The tested strains of enterococci don't have enzymes which are related to the factors of pathogenicity, in particular, they did not have the catalase activity, which have pathogenic aerobic and facultative anaerobic microorganisms, did not produce lecithinase, which causes the depolymerization of cell membranes of the microorganisms. In addition, the tested microorganisms did not produce plasma-coagulase and fibrinolysin that indicate on the apatogenic properties of the studied microorganisms.

The tested strains of enterococci did not cause an irritating effect on the mucous membrane of the eye. In the determination of acute toxicity, it was found out that intra-gastric administration of the tested strains did not cause signs of acute poisoning, death and diseases of laboratory animals. At the same time, during the 14-day observation period, no changes in the clinical condition were detected in the animals.

In long-term use of enterococci, for 28 days, no changes in the clinical condition of laboratory animals were detected, but observed an increase in body weight of the animals. In particular, on the 28th day of the experiment was noted an increase in body weight of the animals which were administered strains of *E. durans* SB6, *E. faecium* SB 12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20, respectively, on 7.7, 7.5, 7, 32 and 10.2 %, compared to the values of animals of the control group.

Keywords: ENTEROCOCCUS, PATHOGENICITY, ACUTE TOXICITY, IRRITATION EFFECT.

У молочній промисловості ентерококи, завдяки здатності витримувати не тільки температуру охолодження, але й пастеризацію і залишатися при цьому життєздатними упродовж тривалого часу, дуже часто використовуються як природні закваски (Giraffa, 2003). Крім того, ентерококи завдяки високій ферментативній активності надають продуктам харчування, особливо деяким видам середземноморських сирів, унікальних сенсорних характеристик, у результаті чого створюються продукти з особливими органолептичними властивостями (Franz, 2003). Проте, незважаючи на корисні властивості ентерококи здатні викликати псування харчових продуктів. Зокрема, наявність *Enterococcus faecium* може спричиняти псування консервованих продуктів за умови недостатнього їх оброблення. У

молочних продуктах потенційними забруднювачами можуть бути *E. faecalis* та *E. faecium*, які є теж відносно термостійкими (Franz, 2003). Наявність в молочних продуктах і молоці ентерококів вказує на недотримання правил гігієни під час одержання та переробки молока (Giraffa, 2003). Отже, у цьому аспекті постає питання щодо безпеки харчових продуктів та доцільності використання ентерококів у якості пробіотиків чи допоміжних культур. Тому, сьогодні надзвичайно актуальним є необхідність поглибленого вивчення ентерококів виділених із харчових продуктів, що дозволить об'єктивно підібрати придатні для створення пробіотичних препаратів штами мікроорганізмів (Arizcun, 1997). Штами, призначені для використання у якості пробіотиків або бактеріальних заквасок не повинні мати вірулентні детермінанти, бути чутливими до антибіотиків і при цьому володіти хорошими функціональними та технологічними властивостями (Franz, 1999, Franz, 2003).

Одним із критеріїв підбору пробіотичних штамів мікроорганізмів є вивчення їх нешкідливості для макроорганізму (Dehtjarenko et al., 2007). При цьому МОЗ України регламентує проведення токсиколого-гігієнічних досліджень і визначення патогенних властивостей нових виробничих штамів мікроорганізмів, а також проведення оптимального обсягу досліджень, які необхідні для обґрунтування гігієнічних регламентів виробничих штамів мікроорганізмів і готових форм препаратів (Наказ МОЗ України від 26 жовтня 2004 року N 521).

Тому, метою нашої роботи було вивчити інфекційність, інвазивність та токсичність ентерококів, виділених із традиційної карпатської бринзи (Slyvka et al., 2018).

Матеріали і методи. При визначенні інфекційності ентерококів лабораторним мишам внутрішньошлунково вводили живі штами *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 у дозі 10^8 КУО на тварину, а при визначенні токсичності – інактивовані мікроорганізми у цій же дозі.

Визначення ферментів, що відносяться до факторів патогенності, зокрема каталази, лецитинази, плазмокоагулазної активності та фібринолітичних властивостей проводили за загальновизнаними мікробіологічними методиками (Labinskaja et al., 2004).

Вивчення подразнюючої дії досліджуваних штамів ентерококів на слизову оболонку очей проводили на 12 статевозрілих кролях-альбіносах. Перед початком експерименту, проводили ретельний огляд очей з метою виявлення пошкоджень. Після цього, кожній тварині у кон'юнктивальний мішок лівого ока вносили по $0,1 \text{ см}^3$ досліджуваного штаму. Після чого, повіки закривали і витримували упродовж 1-2 с, при цьому праве око було контролем. Після застосування досліджуваного препарату тварин оглядали через 1, 24, 48, 72 години та упродовж 14 діб, при цьому враховували наявність гіперемії, набряку, виділень. Оцінку подразнюючої дії речовини на слизову оболонку очей проводили за появою вираженості гіперемії, набряку, виділень згідно з бальною системою (Kosenko et al., 1997).

Вивчення подразнюючої дії досліджуваних штамів (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) на шкіру проводили на 12-и кролях-альбіносах (по три тварини на кожний штам). Для цього за добу до проведення досліду вистригали шерсть на бокових ділянках шкіри, одна з яких була контролем. Площа обробленої поверхні становила 5-8% поверхні тіла тварин. Потім на попередньо підготовлені ділянки шкіри наносили по $0,5 \text{ см}^3$ досліджуваних ентерококів, зверху накладали марлевий тампон і фіксували його напівпрозорою пов'язкою. Подразнюючу дію досліджуваних штамів оцінювали зразу після закінчення 4-годинної експозиції та через 24, 48 і 72 годин. За цих умов враховували ступінь шкірної реакції (почервоніння, підвищення чутливості, припухлість, запалення), наявність еритеми і набряку, а також загальний стан лабораторних тварин. При цьому за тваринами спостерігали упродовж 14 діб.

З метою вивчення гострої токсичності досліджуваних штамів ентерококів за принципом аналогів було сформовано чотири дослідні та контрольну групу білих мишей 2-3 місячного віку, масою тіла 20-22 г. Тваринам контрольної групи застосовували ізотонічний

розчин Натрію хлориду. Тваринам I дослідної групи застосовували *E. durans* SB6, II – *E. faecium*, III – *E. durans* SB18, IV – *E. durans* SB20. Досліджувані штами мікроорганізмів вводили внутрішньошлунково за допомогою шприца із зондом, зранку натще, одноразово у дозі 1×10^{11} КУО/см³.

Після застосування досліджуваних штамів спостереження за лабораторними тваринами вели упродовж 14 діб. При цьому враховували зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерсті, видимих слизових оболонок, відношення до корму, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх одужання.

Визначення підгострої токсичності досліджуваних штамів ентерококів проводили на білих мишах, 2-3-місячного віку, масою тіла 20–22 г. З цієї метою за принципом аналогів було сформовано чотири дослідні і контрольну групи по шість тварин у кожній. Досліджувані штами застосовували внутрішньошлунково, щоденно упродовж 28 діб, за допомогою металевго зонда. Тваринам контрольної групи застосовували ізотонічний розчин Натрію хлориду. Тваринам I дослідної групи застосовували *E. durans* SB6, II дослідної групи – *E. faecium* SB12, III дослідної групи – *E. durans* SB18, тваринам IV дослідної групи – *E. durans* SB20. Тваринам дослідних груп ентерококи застосовували у дозі 1×10^{11} КУО/см³.

Упродовж усього періоду експерименту за лабораторними тваринами вели спостереження, при цьому враховували зовнішній вигляд, поведінку тварин, стан шерстного покриву, видимих слизових оболонок, зміну загального стану тварин, поведінкові реакції, реакції на зовнішні подразники, летальність, зміну маси тіла тварин.

Усі дослідження проводили згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986).

Отримані результати обробляли статистично із визначенням середніх величин, достовірного інтервалу при наявному рівні значимості $p > 0,05$ з урахуванням критерію Стюдента.

Результати й обговорення. Початковим етапом токсико-біологічних досліджень є встановлення небезпечної дії досліджуваного штаму на організм лабораторних тварин. Оскільки, патогенність є видовою генетичною ознакою мікроорганізму тому було проведено дослідження із визначення таких факторів патогенності, як інфекційність та токсичність.

У результаті проведених досліджень встановили, що при дослідженні інфекційності за внутрішньошлункового введення живих ентерококів у дозі 10^8 КУО на тварину, а при дослідженні токсичності – інактивованих мікроорганізмів, білі миші залишалися живими. Упродовж 14-добового періоду спостереження лабораторні миші були активними, мали задовільний апетит. Видимі слизові оболонки були блискучими, блідо-рожевого кольору, шерсть була гладкою, блискучою. Тварини зберігали рефлекторну збудливість на звукові та світлові подразники, змін кольору сечі та калу не спостерігали, загальна поведінка тварин експериментальних і контрольної груп не відрізнялася. Крім того, було встановлено, що за введення різних штамів ентерококів маса тіла тварин у дослідних групах була на рівні величин тварин контрольної групи.

Отже, досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 не патогенні, оскільки були не інфекційні та нетоксичні, тобто не спричиняли будь-яких клінічних симптомів і відхилень загального стану білих мишей.

При розробленні пробіотичних препаратів надзвичайно важливу роль відводять показникам безпечності виробничих штамів. Тому за відсутністю ферментів, що відносяться до факторів патогенності, було визначено нешкідливість ентерококів, що були виділені з карпатської бринзи. Результати дослідження наведено у таблиці 1.

Наявність ферментів патогенності у різних штамів ентерококів

Ферменти	Штами ентерококів			
	<i>E. durans</i> SB6	<i>E. faecium</i> SB12	<i>E. durans</i> SB18	<i>E. durans</i> SB20
Каталаза	—	—	—	—
Продуктування лецитинази	—	—	—	—
Плазмокоагулазна активність	—	—	—	—
Фібринолітичні властивості	—	—	—	—

Примітка: — - відсутність фермента.

Як видно з даних, наведених у таблиці, у досліджуваних штамів ентерококів відсутні ферменти, що відносяться до факторів патогенності. Зокрема, вони не володіють каталазною активністю, яка властива патогенним аеробним та факультативно-анаеробним мікроорганізмам та не виявлено продуктування лецитинази, яка викликає деполімеризацію мембран клітин макроорганізму. Крім того, досліджувані ентерококи не продукують плазмокоагулазу та фібринолізин, що вказує на апатогенні властивості досліджуваних мікроорганізмів.

При виготовленні та практичному застосуванні досліджуваних штамів можливе їх попадання на відкриті ділянки шкіри і слизові оболонки. Тому при дослідженні патогенних властивостей досліджуваних штамів ентерококів визначали їх вплив на шкіру та пошкодження слизових оболонок кон'юнктиви очей кроликів альбіносів.

При вивченні подразнювальної дії на слизову оболонку очей встановили, що відразу після застосування досліджуваних штамів ентерококів була незначна гіперемія кон'юнктиви та слизовиділення, яке зникало упродовж доби. При цьому, слід зазначити, що у подальшому виділень, гіперемії, набряку та змін у судинах не встановлено.

Отже, застосування досліджуваних штамів ентерококів не викликало подразнювальної дії на слизову оболонку ока.

При вивченні подразнювальної дії досліджуваних штамів ентерококів на шкіру тварин було встановлено, що застосування досліджуваних штамів упродовж 4-годинної експозиції не викликало появи місцевого почервоніння, припухлості, запалення, підвищення чутливості та набряку шкіри. Упродовж 14-добового періоду спостереження не було виявлено будь-яких змін у поведінці та загальному стані тварин.

Наступним етапом досліджень було визначення гострої токсичності. При вивченні гострої токсичності було встановлено, що внутрішньошлункове застосування досліджуваних штамів ентерококів не викликало ознак гострого отруєння, загибелі та захворювань лабораторних тварин.

При цьому, упродовж 14-добового періоду спостереження, тварини дослідних груп були активними, мали задовільний апетит, зберігали рефлекторну активність, слизові оболонки зберігали природній блідо-рожевий колір, шкіра була гладкою, блискучою, поряд з тим не було виявлено будь-яких змін у поведінці тварин.

Тривале (28-и добове) застосування досліджуваних штамів (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) теж не викликало загибелі та захворювань дослідних тварин. Лабораторні тварини, упродовж усього експерименту, були активними, охоче поїдали корми, будь-яких змін у поведінці та зовнішньому вигляді тварин не було виявлено. При цьому відзначали тенденцію до зростання маси тіла тварин. Динаміка маси тіла тварин за застосування досліджуваного препарату наведено у таблиці 2.

Динаміка маси тіла за застосування досліджуваного препарату ($M \pm m$, $n=6$)

Групи тварин	Доби експерименту	
	14	28
Контроль	24,6 $\pm$ 0,49	28,5 $\pm$ 0,62
I дослідна	25,5 $\pm$ 0,67	29,7 $\pm$ 0,61
II дослідна	25,7 $\pm$ 0,49	29,8 $\pm$ 0,54
III дослідна	25,8 $\pm$ 0,60	30,2 $\pm$ 0,48
VI дослідна	25,7 $\pm$ 0,67	30,0 $\pm$ 0,52

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, застосування пробіотичних штамів сприяло підвищенню маси тіла тварин дослідних груп, зокрема на 14-у добу експерименту маса тіла тварин, яким застосовували досліджувані штами *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 зростала, відповідно, на – 3,7, 4,5, 4,8 та 4,5 %, порівняно до величин контрольної групи тварин. На 28-у добу експерименту спостерігали аналогічну ситуацію, зокрема, у тварин дослідних груп, які отримували досліджувані штами (*E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20) маса тіла була вищою, відповідно, на – 4,2, 4,6, 5,9 та 5,3 %, порівняно до показників величин тварин контрольної групи.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувані штами ентерококів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 є не патогенними та не інфекційними, не володіють каталазною активністю, не продукують лецитиназу, плазмокоагулазу та фібринолізин.

2. Одноразове застосування штамів *E. durans* SB6, *E. faecium* SB12, *E. durans* SB18, *E. durans* SB20 не викликало подразнюючої дії на слизові оболонки очей та шкіру, ознак інтоксикації, загибелі та захворювань тварин, що дає змогу віднести дані мікроорганізми до нешкідливих для макроорганізму.

3. Довготривале застосування досліджуваних штамів ентерококів, упродовж 28 діб, сприяло зростанню маси тіла тварин.

Перспективи досліджень. Вивчення стійкості ентерококів, виділених з традиційної карпатської бринзи, до дії різних концентрацій натрію хлориду та жовчі.

References

Arizcun, C. (1997). Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38 (1), 17–24.

Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Law, Regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/ EEC). *The Rules Governing Medicinal Products in the European Community*, 1991, 1.145–146.

Dehtjarenko, N.V., Shinkarenko, L.M., Dugan O.M. (2007). Критерії відбору пробіотичних штамів. *Наукovi zapiski*, 67, 30–36. [in Ukrainian].

Franz, C. (1999). *Enterococci at the crossroads of food safety*. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1, 24–29.

Franz, C. (2003). *Enterococci in foods-a conundrum for food safety*. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2–3), 105–122.

Giraffa, G. (2003). *Functionality of enterococci in dairy products*. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2–3), 215–222.

Kosenko, M.V., Malik, O.G., Kocjumbas, I.Ja., Paterega, I.P., Chura, D.O. (1997). Toksikologichnij kontrol' novih zasobiv zahistu tvarin: Metodichni rekomendacii. 34. [in Ukrainian].

Labinskaja, A.S., Blinkovskaja, L.P., Eshhina, A.S. (2004). Obshhaja i sanitarnaja mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij Uchebnoe posobie. M., Medicina, 576. [in Ukrainian].

Mediko-biologichni doslidzhennja virobnichih shtamiv mikroorganizmiv i toksikologigigienichna ocinka mikrobnih preparativ, viznachennja ih bezpeki ta obgruntuvannja higienichnih normatyviv i reglamentiv Nakaz MOZ Ukrainy vid 26 zhovtnja 2004 roku N 521. Electronnuj resurs / https://zakononline.com.ua/documents/show/43806_43806. [in Ukrainian].

Slyvka, I.M., Tsisaryk, O.Y., Dronyk, G.V., Musiy, L.Y. (2018). Strains of lactic acid bacteria isolated from traditional Carpathian cheese. Regul. Mech. Biosyst. 9 (1), 62-68. Available at: <https://doi.org/10.15421/021808>.