

ВИКОРИСТАННЯ СЕЛЕНОВМІСНОЇ БІОМАСИ НОВИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ КОРЕКЦІЇ СКЛАДУ МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКУ ЩУРІВ

М. В. Камінська, Г. І. Нечай, Н. І. Борецька, Г. В. Колісник, С. В. Гураль,
Н. І. Цепко, Ю. В. Небиловський

Інститут біології тварин УААН

У роботі представлені дані про отримання селеновмісної біомаси дріжджів *S. cerevisiae* при культивуванні селекціонованих штамів № 1 і № 106 в середовищі з селенітом натрію. Встановлено, що внесення в середовище селеніту натрію з розрахунку 1 мг Se/мл не впливає на ріст культури. При зростанні вмісту селену до 5 мг/мл зменшується кількість біомаси штаму № 1 на 41 %, а штаму № 106 — на 17 %. Отримана біомаса містила селен у концентрації 2 мг/г. Встановлено антагоністичний вплив штамів на умовнопатогенні мікроорганізми. Введення до раціону щурів селеновмісної біомаси дріжджів у кількості 20 мг на 100 г корму позитивно впливало на мікробоценоз кишечника при оксидативному стресі, змодельованому введенням тетрахлорметану. У вмісті кишечника щурів збільшувалась кількість штамів кишкової палички з нормальною ферментативною активністю і зменшувалась загальна кількість стрепто- і стафілококів.

Дослідження ендоекології тварин свідчить, що мікрофлора травного тракту і макроорганізм — це взаємозв'язані і взаєморегулюючі біологічні системи. Під впливом несприятливих факторів довкілля та хіміотерапевтичних препаратів відбуваються зміни в мікробоценозі, виникає дисбактеріоз, що приводить до захворювань сільськогосподарських тварин та зниження їх продуктивності [1]. Збереження мікрофлори і запобігання порушень її складу є важливою та актуальною проблемою.

Для направленої впливу на склад кишкової мікрофлори використовують пробіотики — живі мікроорганізми, найчастіше біфідобактерії, лактобацили та ін. мікроорганізми [2, 3]. Лікувальний ефект пробіотики проявляють, змінюючи імуногенність чужорідних білків шляхом протеолізу, знижуючи секрецію медіаторів запальних процесів в кишечнику та інтестинальну проникливість. В якості пробіотиків можна використовувати дріжджі, олігосахариди клітинної стінки яких запобігають колонізації кишечника патогенними мікроорганізмами, посилюють імунний захист і резистентність тварин [4]. Поряд із ними використовуються і пребіотики — речовини, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів. До пребіотиків відносяться моно- і олігосахариди, пептиди і антиоксиданти [5]. В умовах антропогенного забруднення довкілля ксенобіотиками особливу увагу дослідників привертають антиоксиданти, до яких відноситься і селен. Відомо, що селенізовані дріжджі є більш засвоюваним джерелом селену, ніж мінеральні сполуки цього елемента, як для тварин, так і для людини. Вважають, що біля 80 % селену у клітинах дріжджів знаходиться у формі селен-метіоніну. Використання біомаси дріжджів, яка містить селен, як кормової добавки у годівлі тварин дозволить підвищити не тільки продуктивність, але і якість продукції, яка буде містити антиоксиданти і захищати організм від оксидативного стресу, що лежить в основі механізмів виникнення багатьох хвороб.

Метою даної роботи було отримання селеновмісної біомаси селекціонованих штамів дріжджів *S. cerevisiae* та застосування її для відновлення нормальної мікрофлори кишечника.

Матеріали і методи. У роботі використовували культури дріжджів селекціонованих селенорезистентних штамів *Saccharomyces cerevisiae*, отриманих з колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України. Штами дріжджів культивували в середовищі Беркгольдера такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3; дріжджовий екстракт — 2; сахароза — 20, біотин — 2×10^{-6} . Як джерело селену додавали селеніт натрію у відповідних концентраціях. Дріжджі вирощували в колбах Ерленмейера

об'ємом 500 мл з 100 мл середовища на качалці (200 об/хв) при температурі 30 °С. Визначення біомаси дріжджів проводили ваговим методом, а також турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda = 590$ нм, кювета 5мм).

Антагоністичну дію досліджуваних штамів дріжджів *S. cerevisiae* визначали методом відстроченого антагонізму з використанням тест-культур.

З метою з'ясування впливу згодовування біомаси дріжджів на мікробоценоз кишечника було проведено дослід на самцях щурів лінії Вістар із початковою масою тіла 120–130 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварини були поділені на 2 групи (по 8 тварин): 1 — контрольна група; 2 — щури, яким згодовували селенізовану біомасу дріжджів *S. cerevisiae* (0,02 %) з вмістом селену в біомасі 2 мг/г. На 12 день досліду кожен групу тварин було розділено на 2 підгрупи. Тваринам однієї підгрупи з кожної групи вводили тетрахлорметан у дозі 0,2 мл/100 г маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину. Тетрахлорметан вводили внутріочеревинно два рази через день. Забій тварин проводили через 48 год після останнього введення токсиканту. У зразках вмісту кишечника досліджували видовий кількісний та якісний склад мікрофлори методом розведень та висіванням мікроорганізмів на селективні середовища [6]. Ідентифікацію їх проводили за морфологічними, культуральними, фізіологічними та біохімічними властивостями.

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи критерій Стьюдента за допомогою програми *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення. Для отримання селеновмісної біомаси було вивчено нагромадження біомаси досліджуваними штамми дріжджів *S. cerevisiae* у середовищі з різною концентрацією селеніту натрію. Одержані результати показують (табл. 1), що додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/мл) до поживного середовища не впливає на ріст досліджуваних штамів дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 5 мг/л знижується інтенсивність росту клітин дріжджів та зменшується кількість нагромадженої біомаси штаму *S. cerevisiae* 106 на 41 %, а штаму *S. cerevisiae* 1 — на 17 %.

Таблиця 1

Вплив селеніту натрію на ріст дріжджів *S. cerevisiae* ($M \pm m$, $n=3$)

Селен, мг/л	Біомаса дріжджів, г/л	
	<i>S. cerevisiae</i> 1	<i>S. cerevisiae</i> 106
0	1,54±0,06	1,95±0,02
1	1,51±0,03	1,87±0,02
5	0,91±0,06*	1,61±0,02***
7,5	0,83±0,08*	1,66±0,01***
10	0,77±0,07*	1,51±0,02***

Примітка. * — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Для використання штамів мікроорганізмів з метою нормалізації мікрофлори кишечника важливе значення має їх антагоністична дія по відношенню до патогенних та умовнопатогенних мікроорганізмів.

Антагоністичну дію досліджуваних штамів № 1 та № 106 дріжджів *S. cerevisiae* визначали методом відстроченого антагонізму з використанням тест-культур *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та *Staphylococcus aureus* (табл. 2).

Таблиця 2

Антимікробна активність штамів дріжджів *S. cerevisiae* (ширина зони пригнічення росту, см)

Штам дріжджів	<i>St. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. cerevisiae</i> 1	—	—	1,2
<i>S. cerevisiae</i> 106	—	—	0,6

Встановлено, що штами дріжджів *S. cerevisiae* 1 і *S. cerevisiae* 106 пригнічують ріст *Escherichia coli*, але не проявляють антагоністичної дії на *Bacillus subtilis* та *Staphylococcus*

aureus. Слід відмітити, що часткова антагоністична дія досліджуваних штамів дозволяє використовувати їх в якості пробіотичних препаратів, оскільки дріжджі, як пробіотики, не можуть колонізувати травний тракт, але індукують позитивні ефекти в жуйних та нежуйних видів тварин внаслідок дії компонентів клітинної стінки.

Отриману біомасу дріжджів штаму 106 з концентрацією селену 2 мг/г було використано для дослідження впливу біомаси селеновмісних дріжджів на видовий склад мікрофлори порожнини товстої кишки щурів за стандартних умов утримання та за умов оксидативного стресу.

У пробах вмістимого кишечника щурів груп на раціоні з біомасою селеновмісних дріжджів загальна кількість кишкової палички була на $0,33 \log_{10}$ КУО (колонієутворюючі одиниці)/г більшою, ніж у вмістимому кишки щурів контрольної групи, за рахунок бактерій з нормальною ферментативною активністю (табл. 3).

Зникнення гемолізуючих штамів кишкової палички при згодовуванні щурам селеновмісних дріжджів, можливо, пояснюється присутністю селену у концентрації, що частково пригнічує ріст цієї мікрофлори.

Таблиця 3

Склад основної мікрофлори порожнини товстої кишки щурів за стандартного раціону з добавкою селеновмісної біомаси дріжджів ($M \pm m$, $n=4$)

Примітка: * — $P < 0,01$

Склад факультативної мікрофлори (протей, гриби, дріжджі) дослідної групи також зазнав змін. Вміст протею у вмістимому товстої кишки щурів зменшився на $0,17 \log_{10}$ КУО/г, було відзначено зникнення грибків, що позитивно впливає на організм тварин.

У той же час, із вмістимого кишки дослідних щурів було висіяно дріжджі, які додавались до раціону. Ймовірно, дріжджі у кишечнику тварин залишаються життєздатними і не повністю руйнуються під дією ферментів шлунково-кишкового тракту.

Для оцінки захисної дії препаратів селеновмісних дріжджів на організм тварин було змодельовано оксидативний стрес. Під дією тетрахлорметану ми спостерігали зміни у мікрофлорі товстої кишки щурів, що перебували на стандартному раціоні без добавок

Мікроорганізми	Стандартний комбікорм (СК)	СК+біомаса дріжджів <i>S.cerevisiae-Se</i>
Заг. кількість кишкової палички, \log_{10} КУО/г	7,57±0,07	7,90±0,10*
— з нормальною ферментативною активністю, %	87,0±2,5	87,5±2,7
— з слабковираженими ферментативними властивостями, %	12,94±1,20	12,50±1,00
— лактозонегативні ентеробактерії, %	0	0
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0,06±0,01	0
Кокові форми в загальній кількості мікробів, %	14,8±1,2	12,5±1,1
Біфідобактерії, мт/г	10^7	10^7
Лактобактерії, мт/г	10^5	10^5
Протей, \log_{10} КУО/г	4,60±0,42	4,43±0,12
Гриби роду <i>Candida</i> , \log_{10} КУО/г	4,00±0,35	0
Дріжджі	0	1×10^2

дріжджової біомаси. Ми відзначили збільшення на 34 % відносного вмісту кокових форм (стафіло- та стрептококів) на фоні зменшення загальної кількості кишкової палички (табл. 4). Цей показник перевищував норму в 1,95 рази і провокував стафілококовий дисбактеріоз. Змін у відносних та абсолютних кількостях інших родових груп мікроорганізмів не було.

Таблиця 4

Склад основної мікрофлори порожнини товстої кишки щурів за навантаження тетрахлорметаном та раціону з добавкою селеновмісної біомаси дріжджів ($M \pm m$, $n=4$)

Примітка: * та *** — різниця між даним показником і показником у групі із СК статистично достовірна ($P < 0,025$) та ($P < 0,001$) відповідно; + — різниця між даним показником і показником у групі СК з навантаженням статистично достовірна ($P < 0,01$).

Внесення селеновмісних дріжджів на фоні введення тетрахлорметану давало ефект, який проявлявся на $0,34 \log_{10}$ КУО/г зростанням загальної кількості кишкової палички та зменшенням кількості кокових форм (на 18,8 %), порівняно з стандартним раціоном з навантаженням. Однак, відносна кількість кокових форм за стандартного раціону та з добавкою селеновмісних дріжджів перевищувала приблизно у 3–4 рази допустимі норми.

Слід відзначити, що в кишечнику тварин усіх дослідних груп змін у концентрації біфідобактерій та лактобактерій не відбулось. Дані види бактерій виявились стійкими до впливу тетрахлорметану на організм щурів та змін у раціонах.

Таким чином, встановлено, що біомаса селеновмісних дріжджів у досліджуваній кількості частково захищає мікрофлору кишечника щурів від порушень за умов оксидативного стресу, однак не приводить цей показник до норми. У подальшій роботі буде

Мікроорганізми	Стандартний комбікорм (СК)	СК з навантаженням	СК+біомаса <i>S.cerevisiae</i> -Se з навантаженням
Заг. кількість кишкової палички, \log_{10} КУО/г	7,57±0,07	7,36±0,24*	7,70±0,33 ⁺
— з нормальною ферментативною активністю, %	87,0±2,5	65,0±1,8***	60,0±1,2
— з слабковираженими ферментативними властивостями, %	12,94±1,20	34,96±2,10***	39,98±2,0
— лактозонегативні ентеробактерії, %	0	0	0
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0,06±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01
Кокові форми в загальній кількості мікробів, %	14,8±1,2	48,8±2,3***	30,0±2,1 ⁺
Біфідобактерії, мт/г	10^7	10^7	10^7
Лактобактерії, мт/г	10^5	10^5	10^5
Протей, \log_{10} КУО/г	4,60±0,42	0	$(1,3±0,1) \times 10^4$
Гриби роду <i>Candida</i> , \log_{10} КУО/г	4,00±0,35	0	4,10±0,20
Дріжджі	0	0	1×10^2

доцільно селекціонувати штами, що нагромаджують менше селену. Їх біомасу можна буде вносити у раціон у більших кількостях для ефективного застосування як пробіотика.

В И С Н О В К И

1. Додавання селеніту натрію (з розрахунку 1 мг Se/мл) до поживного середовища не впливає на ріст досліджуваних штамів дріжджів. При підвищенні вмісту селену в середовищі до 5 мг/л зменшується кількість нагромадженої біомаси штаму *S. cerevisiae* 106 на 41 %, а штаму *S. cerevisiae* 1 — на 17 %.

2. Штами дріжджів *S. cerevisiae* 1 і *S. cerevisiae* 106 пригнічують ріст *Escherichia coli*, але не проявляють антагоністичної дії на *Bacillus subtilis* та *Staphylococcus aureus*.

3. Внесення у раціон щурів селеновмісних дріжджів у кількості 20 мг на 100 г корму позитивно впливає на мікробіоценоз кишечника при оксидативному стресі, змодельованому введенням тетрахлорметану.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕНОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ НОВЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ДЛЯ КОРРЕКЦИИ СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА КРЫС

М. В. Каминская, Г. И. Нечай, Н. И. Борецкая, Г. В. Колисник,
С. В. Гураль, Н. И. Цепко, Ю. В. Небыловский

АННОТАЦИЯ

В работе представлены данные о получении селеносодержащей биомассы дрожжей *S. cerevisiae* при культивировании селекционированных штаммов № 1 и № 106 в среде с селенитом натрия. Установлено, что внесение в среду селенита натрия из расчета 1 мг Se/мл не влияет на рост культуры. При увеличении содержания селена до 5 мг/г уменьшается количество биомассы штамма № 1 на 41 %, а штамма № 106 — на 17 %. Полученная биомасса дрожжей содержала селен в концентрации 2 мг/г. Установлено антагонистическое влияние штаммов на условнопатогенные микроорганизмы. Внесение в рацион крыс селеносодержащих дрожжей в количестве 20 мг на 100 г корма положительно влияло на микробоценоз кишечника при оксидативном стрессе, смоделированном введением тетрахлорметана. В содержимом кишечника крыс увеличивалось количество штаммов кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью и уменьшалось общее количество стрепто- и стафилококков.

USING OF SELENIUM ACCUMULATING BIOMASS OF NEW YEAST STRAINS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FOR THE RATS FECAL MASSES MICROFLORAS COMPOSITION CORRECTION

*M. V. Kaminska, H. I. Netchai, N. I. Boretska, H. V. Kolisnyk,
S. V. Hural, N. I. Tsepko, Y. V. Nebylovskyy*

SUMMARY

The data about obtaining selenium accumulating biomass of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is presented in this article. The selected strains № 1 and № 106 were grown in the environment with sodium selenite. The addition of sodium selenite to the environment (1 mg/ml) did not influence the culture's growth. The biomass of strains № 1 and № 106 decreased by 41 % and 17 % respectively under the Se-content increase up to 5 mg/ml. The content of Se in the yeast biomass was 2 mg Se/g. The expressed antagonistic influence of the strains on pathogenic microorganisms was established. The effect of selenium accumulating yeasts biomass (20 mg per 100 g food) on the rat's fecal masses microflora composition at the oxidative stress was studied. The increase of the *Escherichia*'s strains with normal fermentative activity and the decrease of the strepto- and staphylococcus level was shown.

ЛІТЕРАТУРА

1. Насонова Т. А. Современные представления о значении нормальной микрофлоры тела в норме и патологии [Текст] / Насонова Т. А., Мальцев В. Н. // Успехи современной биологии. — 1983. — Т. 96, вып. 1 (4). — С. 139–150.
2. Смирнов В. В. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов [Текст] / Смирнов В. В., Коваленко Н. К., Подгорский В. С. // Мікробіол. журн. — 2002. — Т. 64, № 4. — С. 62–79.
3. Антипов В. А. Использование пробиотиков в животноводстве [Текст] / В. А. Антипов // Ветеринария. — 1999. — № 4. — С. 55–58.
4. Newbold C. J. Mechanisms of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants [Text] / Newbold C. J., Wallace R. J., McIntosh F. M. // Br. J. Nutr. — 1996. — 76 (2). — P. 249–261.
5. Gibson G. R. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [Text] // J. Nutr. — 1995. — № 125. — P. 1401–1412.
6. Красноголовец В. Н. Дисбактериоз кишечника [Текст] : монография / В. Н. Красноголовец ; под ред. М. Х. Левитана. — Москва : Медицина, 1989. — 208 с. — 5000 экз. — ISBN 5-225-00337-0.