

4. Matolinets O. Solovodzinska I., Yastremska S. Condition of endogen intoxication, immune system and processes of free radical oxidation in different age group animals. //Tethes of III International Medical Congress of students and young scientists. – Ternopol. – 1999. – P. 315.

5. Pilipiv I. I. Metabolical reactions of heifer's bodies under the high conditions of cadmium and zinc // Materials of international science-research congress, 8-10 October 2003r. - Chernivtsi, 2003. - P. 54–55.

6. Standards and ration feeding farm of animals: a handbook / [ed. A. V. Kalashnikov, N. I. Kleimenova etc.]. – М.: Agropromizdat, 1985. – 352 p.

Стаття надійшла до редакції 13.03.2015

УДК 636.52/58.087.8:612.1

Бібен І.А., к. вет. н., доцент

E-mail: bibenvet@ukr.net

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет,
м. Дніпропетровськ

ІНДИКАЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ СПОРОНОСНИХ БАКТЕРІЙ З ПРОБІОТИЧНОЮ ПОТЕНЦІЄЮ

З фекалій здорових підсвинків та об'єктів зовнішнього середовища рутинними методами були ізольовані 12 культур сінних бацил у чистому вигляді та вивчені їх основні біологічні властивості. При цьому тільки дві культури були повністю апатогенні, у них були відсутні ферменти патогенності - гемолізину та лецитиназа, а при зараженні, у лабораторних тварин інфекційна патологія не розвивалась.

Культури бацил володіли типовими для виду морфо-тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями, на підставі чого згідно короткого визначника бактерій Берджі були ідентифіковані як *Bacillus subtilis* і зареєстровані як штами VI-9 і VI-12. Культури депоновані і проводиться процедура патентування та паспортизації.

Депоновані штами сінних бацил проявили виражену антагоністичну активність щодо широкого кола патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів та можуть бути використані як основа для створення пробіотичних препаратів.

Ключові слова: *Bac. subtilis*, пробіотичні культури, антагоністична активність, транзиторна мікрофлора, біологічні властивості, стійкість до антибіотикорезистентності

УДК 636.52/58.087.8:612.1

Бибен И. А., к. вет. н., доцент

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет,
г. Днепропетровск

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПОРОНОСНЫХ БАКТЕРИЙ С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ПОТЕНЦИЯМИ

Из фекальных масс и объектов внешней среды рутинными методами были изолированы 12 культур сенных бацилл в чистом виде и изучены их основные свойства. При этом только две культуры были полностью апатогенны, а именно у них отсутствовали ферменты патогенности – гемолизины и лецитиназа, и при заражении лабораторных животных не возникала инфекционная патология.

Культури бацилл обладали типичными для вида морфо-тинкториальными, культуральными и биохимическим свойствами, на основании чего согласно ключа краткого определителя бактерий Берджи были идентифицированы как *Bacillus subtilis* и зарегистрированы как штаммы BI-9 и BI-12. Культуры депонированы и проводится процедура патентования и паспортизации.

Депонированные штаммы сенных бацилл проявили выраженную антагонистическую активность в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и могут быть использованы как основа для создания пробиотических препаратов.

Ключевые слова: *Bac. subtilis*, пробиотические культуры, антагонистическую активность, транзиторная микрофлора, биологические свойства, устойчивость к антибиотикам, антибиотикоустойчивость

UDC 636.52/58.087.8:612.1

Biben I.A. Ph.D, Associate Professor, e-mail: bibenvet@ukr.net
Dnepropetrovsk State Agrarian-economics University, Dnepropetrovsk

INDICATION AND IDENTIFICATION OF SPORE-FORMING BACTERIA WITH PROBIOTIC POTENCY

Of fecal and environmental objects routine methods were isolated 12 culture bacillus in pure form and study their basic properties. However, only two crops were completely nonpathogenic, namely they have no enzymes pathogenicity - hemolysin and lecithinase, and infection of laboratory animals emerging infectious pathology.

*Culture bacilli had typical type of morpho-tinctorial, cultural and biochemical properties, whereby according to a key determinant of short Burgi bacteria were identified as *Bacillus subtilis* strains and registered as BI-9 and BI-12. Culture deposited and held patents and certification procedure.*

Deposited strains hay bacillus showed pronounced antagonistic activity against a wide range of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms and can be used as a foundation for probiotics.

Key words: *Bac. subtilis*, probiotic cultures, antagonistic activity, transient microflora, biological properties, resistance to antibiotics

Вступ. Пробиотики - це біопрепарати, виготовлені з живих антагоністично активних бактерій, представників нормальної або резидентної мікрофлори - лактобактерії, біфідобактерії, кишкова паличка, аерококи, сапрофітні спороносні бактерії. За сукупністю фізіолого-біохімічних властивостей і факторів біологічної активності перспективними для створення пробіотиків з неіндігенної мікрофлори виявилися бацили, що відносяться до видів *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. megaterium*. Ці види сапрофітних бацил-антракоїдів мають виражені антагоністичні властивості відносно різних мікробіоценозів, стабільно виділяються з різноманітних біотопів, у тому числі з організму і тканин теплокровних тварин, а також комах і рослин [1, 2, 4, 5, 7].

Мікробіологічні та біотехнологічні дослідження, щодо використання живих мікробних сапрофітних культур з пробіотичними потенціями з роду *Bacillus* для профілактики і лікування шлунково-кишкових захворювань у молодняка сільськогосподарських тварин, мають важливе науково-практичне значення. Виявлено здатність бацил підвищувати імунітет до інфекційних захворювань, так як вони індукують синтез ендogenous інтерферону за перорального застосування. Продукти біосинтезу мікробних культур сапрофітних бацил-антракоїдів являються

нативними стимуляторами росту молодняка, оптимізують мікробіальний склад товстого відділу кишечника [1, 3-5, 8, 11].

Важливим для науки і практики ветеринарної медицини є питання про біологічні властивості сапрофітних бацил-антракоїдів, що ізолюють з об'єктів живої та неживої природи у зв'язку з вивченням механізму їх впливу на макроорганізм як пробіотичних культур. Це необхідно для створення ефективних лікувально-профілактичних препаратів, оскільки пробіотичні бацили проявляють антагоністичні властивості по відношенню до різних мікроорганізмів та грибів, при цьому найбільша біологічна активність відзначається у пробіотичних культур *Bacillus subtilis* [4, 5, 7, 9, 10].

Мета роботи: виділити з об'єктів живої і неживої природи сінешні бацили і вивчити їх морфо-тинкторіальні, культуральні, біохімічні властивості, антибіотикостійкість і антагоністичну активність.

Матеріал і методи. Індикацію та ідентифікацію культур спороносних бактерій проводили шляхом висіву дослідного матеріалу на чашки Петрі з щільним поживним середовищем, посіви поміщали в термостат за 37-38 °С на 18-24 год, переглядали, готували мазки і фарбували їх за Грамом, виділяли культури спороносних бактерій [6].

В якості поживних середовищ використовували МПА, МПБ, модифіковану середу гауз № 2, МПА з додаванням 7 % NaCl, 5 % кров'яний МПА для визначення гемолітичних властивостей, яечний бульйон для тестування лецитіназної активності, казеїновий і крохмальний агар для визначення ферментативних властивостей.

Біохімічні властивості бацил визначали на середовищах Олькеницького з індикатором бромтимоловим синім і карбогідратами - глюкозою, ксилозою, манітом, сахарозою, мальтозою, саліцином і ескуліном.

Утилізацію цитрату і пропіонату тестували на середовищі Козера, здатність відновлювати нітрати - в бульйоні з нітратами, визначення в середовищі ацетону (реакція Фогеса-Проскауера) проводили на середовищі Кларка. Здатність продукувати сірководень вивчали на середовищі Клігlera; каталазну активність виявляли в реакції з 3 % H₂O₂; здатність культур виробляти індол - на поживному бульйоні з індикатором; фермент уреазу - на середовищі з сечовиною (по Крістенсену).

Антагоністичну активність тестували методом відстроченого антагонізму по відношенню до патогенних і умовно патогенних бактерій.

Статистичну обробку цифрового матеріалу проводили за загальноприйнятими методиками.

Результати дослідження. Експериментальні дослідження з індикації та ідентифікації сапрофітних пробіотичних культур *Bac. subtilis* із об'єктів зовнішнього середовища та від здорових підсвинків, а також вивчення біологічних характеристик сінних бацил проводили у НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського ДАЕУ і бактеріологічному відділі Дніпропетровської ДЛВМ.

Видову належність ізольованих культур бацил-сапрофітів здійснювали згідно загальноприйнятих методик по ключу короткого визначника бактерій Берджі за сукупністю базисних характеристик.

Культуральні властивості сінних бацил вивчали при посіві мікробів на щільну елективну середу гауз №2 при цьому виявили три варіанти структурування колоній, а саме: - округлі, великі, з рівними краями, випуклі, куполоподібні, матові,

зернисті, шорсткі колонії, а також зернисті колонії з виступаючим центром; - амебоподібної форми з хвилястими краями, зморшкуваті, плоскі, шорсткі колонії; - округлі, випуклі, куполоподібні, шорсткі колонії з хвилястими краями.

Усі три морфологічних варіанти колоній були світло-сірого кольору і синтезували пігмент від бежевого до рожевого відтінків.

За світлової мікроскопії під імерсією у препаратах-мазках забарвлених за Грамом виявили Г+ стрептобацили та поодинокі клітини розміром $2,8-3,2 \times 0,6-0,8$ мкм з ендоспорами.

З усіх ізольованих культур бацил-антракоїдів тільки дві не володіли факторами патогенності (гемолітичною та лецитіназною активністю), тому їх обрали для подальших досліджень і зареєстрували в музеї культур як штами VI-9 і VI-12 *Bac. subtilis*.

Фізіолого-біохімічні властивості непатогенних культур сінних бацил-антракоїдів були типовими для виду та характеризувалися рухливістю, здатністю утилізувати глюкозу, ксилізу, маніт, сахарозу, мальтозу, гідролізувати ескулін і крохмаль, не утилізували лактозу і саліцин, не утворювали газ при розщепленні глюкози. Штами мали здатність до росту на середовищах з 7 % NaCl і цитрату, відновлювали нітрати, які не продукували індол, сірководень і фермент уреазу, не утилізували пропіонат, гідролізований крохмаль та казеїн, а також розріджували 10 % желатину. У штамів не виявлено патогенних властивостей, про що свідчить відсутність гемолітичної та лецитіназної активності.

Антагоністичні потенції культур сінних бацил-антракоїдів вивчали в дослідях *in vitro* за методом відстроченого антагонізму відносно патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Встановили, що дослідні культури мали високу антагоністичну активність щодо широкого спектра бактопатогенів, при цьому величина зони затримки росту (спосіб радіальних штрихів) становила ($M \pm m$ в мм) у штамі:

- VI-9 щодо *Staphilococcus aureus* 209 - 25 ± 4 ; *Staphilococcus epidermidis* 22 ± 3 ; *Staphilococcus saprophiticus* - 25 ± 4 ; *Salmonella typhimurium* - 13 ± 3 ; *Salmonella enteritidis* - 14 ± 4 ; *Salmonella gallinarum-pullorum* - 16 ± 4 ; *Shigella sonnei* - 12 ± 2 ; *Esherichia coli* - 28 ± 3 ; *Proteus vulgaris* - 29 ± 4 . *Proteus mirabilis* - 19 ± 2 ; *Pasteurella multocida subsp. gallinarum* - 18 ± 4 ; *Candida albicans* - 26 ± 4 ;

- VI-12 у відношенні *Staphilococcus aureus* 209 - 26 ± 4 ; *Staphilococcus epidermidis* - 24 ± 3 ; *Staphilococcus saprophiticus* - 26 ± 4 ; *Salmonella typhimurium* - 14 ± 3 ; *Salmonella enteritidis* - 17 ± 4 ; *Salmonella gallinarum-pullorum* - 18 ± 4 ; *Shigella sonnei* - 12 ± 2 ; *Esherichia coli* - 26 ± 3 ; *Proteus vulgaris* - 30 ± 4 . *Proteus mirabilis* - 22 ± 2 ; *Pasteurella multocida subsp. gallinarum* - 26 ± 4 ; *Candida albicans* - 28 ± 4 .

Методом серійних розведень визначили чутливість пробіотичних бацил до найпоширеніших антибіотиків, у роботі використовували пеніцилін, стрептоміцин, канаміцин, ампіцилін, доксициклін.

Добова культура *Bac. subtilis* штам VI-9 була стійка до антибіотиків в наступній концентрації: пеніциліну - 1,4 мг; стрептоміцину - 0,9 мг; канаміцину - 1,6 мг; ампіциліну - 1,1 мг; доксицикліну - 1,6 мг.

Добова культура *Bac. subtilis* штам VI-12 була стійка до антибіотиків в наступній концентрації: пеніциліну - 1,5 мг; стрептоміцину - 0,8 мг; канаміцину - 1,5 мг; ампіциліну - 1,2 мг; доксицикліну - 1,5 мг.

Отримані результати вказують, що культура *Bac. subtilis* штам VI-12 проявляє виражену антагоністичну активність до широкого спектру патогенних і

умовно-патогенних мікроорганізмів, проявляючи при цьому незначну стійкість до найбільш поширених антибіотиків.

У біопробі на білих мишах живою масою 18-20 г (n=6) за підшкірного та внутрішньочеревного зараження добовою бульйонною культурою у дозі 1,0 см³ ніяких патологічних змін упродовж 14 діб спостереження не виявили, що свідчить про біобезпеку дослідних культур сінних бацил.

Висновки.

1. Із об'єктів зовнішнього середовища свиноферми та фекалій здорових підсвинків були ізольовані 12 культур сапрофітних бацил-антракоїдів, ідентифікованих як *Bacillus subtilis*, з яких дві культури володіли пробіотичними потенціями та були депоновані як штами VI-9 і VI-12 індигенної транзитornoї резидентної мікрофлори.

2. Культури *Bac. subtilis* штами VI-9 і VI-12 мали типові для виду базисні характеристики, проявляли виражений протимікробний антагонізм відносно представників кишкового мікробіоценозу та незначну стійкість до антибіотиків, були біохімічно активними, не володіли факторами патогенності та не викликали інфекційної патології в біопробі на білих мишах.

Перспективи подальших досліджень полягають у використанні культур *Bac. subtilis* штамів VI-9 і VI-12 як основи при створенні пробіотичних препаратів, в результаті їх вираженою антагоністичної активності відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів.

Література

1. Авдос'єва І.К. Вплив нового вітчизняного пробіотика «Біонорм П» на ефективність вакцинації проти вірусних хвороб бройлерів / І.К. Авдос'єва, В.В. Регенчук, О.Б. Басараб та ін. [Текст] // Ветеринарія. – 2011. - № 10(107). – С. 12-14.
2. Апатенко В. Багаторівнева структура паразитоценозів в інфекційній патології / В. Апатенко [Текст] // Ветеринарна медицина України. – 2001. - № 9. – С. 16-17.
3. Бессарабов Е. Опыт применения микродисперсной формы пробиотика «Лактобифадол» курам / Е. Бессарабов [Текст] // VI Международный ветеринарный конгресс по птицеводству, 26-29 апреля 2010 г. – М. – С. 158-163.
4. Осипова И.Г. Споровые пробиотики / И.Г. Осадчая, Н.А. Михайлова, И.Г. Сорокулова и др. [Текст] // Журн. микробиол. – 2003. - № 3. – С. 113-119.
5. Коршунов В.М. Влияние пробиотиков и биотерапевтических препаратов на иммунную систему организма-хозяина / В.М. Коршунов [Текст] // Педиатрия. – 2002. № 5. – С. 92-95.
6. Методические рекомендации по изучению биологических свойств бактерий рода *Bacillus*. – М., 1998.
7. Тришина Н.В. Связь между развитием дисбактериоза кишечника и состоянием антиэндоксинного иммунитета: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Москва, 2003. – 24 с.
8. Bansal S. Probiotics in health and diseases / S. Bansal [Text] // J. Assoc. physicians. – 2001. - № 7. – P. 734-741.
9. Buchell M.E. A physiological model for of erythromycin production in bath and cyclyc fed bath culture / M.E. Buchell, J. Smith, H.C. Lynch [Text] // Microbiology. – 1997. – Vol. 143, № 2. – P. 475-480.
10. Factorial correspondence analysis of fear-related behavior traits in Japanese quail / S. Mignon-Grasteau, O. Roussot, C. Delaby et al. // Behaviour Processes. – 61(1-2). – 2003. – P. 69-75.
11. Kerti A. Content of retinol and retinyl esters in blood plasma, liver, kidney and reproductive organs of Japanese quails / A. Kerti, I. Buchholz, F.J. Schweigert [Text] // Acta Vet. Hung. – 50(4). – 2002. – P. 435-443.

Стаття надійшла до редакції 1.07.2015