

ВИВЧЕННЯ *IN VITRO* АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ІЗОЛЯТІВ РОДУ *BACILLUS* ТА ВІДБІР ПЕРСПЕКТИВНИХ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ

О. М. Чечет, канд. вет. наук,
В. Л. Коваленко, д-р вет. наук, професор,
О. І. Горбатюк, канд. вет. наук, доцент,
О. С. Гайдей, канд. вет. наук, с. н. с.,
О. Л. Кравцова, молодший науковий співробітник,
В. О. Андріяшук, канд. вет. наук,
І. В. Мусієць, молодший науковий співробітник,
Д. О. Ординська, молодший науковий співробітник

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики
і ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна
o.chechet@vetlabresearch.gov.ua

Ефективність пробіотичних препаратів визначається сукупністю біологічних властивостей штамів культур, які входять до їх складу. На сучасному етапі розвитку біологічної антибактеріальної терапії для знешкодження бактеріальних інфекцій все частіше використовують непатогенні пробіотичні спороутворюючі мікроорганізми, зокрема бактерії роду *Bacillus*. Метою роботи був пошук перспективних пробіотичних штамів й відповідно завдання полягали у визначенні *in vitro* антагоністичної активності виділених від птиці ізолятів *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* і *Bacillus coagulans* до щодо стандартних тестових культур грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 і *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та відбір найбільш перспективних штамів для конструювання комплексного пробіотичного препарату «Біомагн». Було досліджено 27 ізолятів роду *Bacillus*, виділених від птиці із птахогосподарств України та ідентифікованих як вид *B. subtilis* — 13 штамів, *B. licheniformis* — шість штамів, *B. coagulans* — вісім штамів. Дослідження з визначення антагоністичної активності виділених ізолятів роду *Bacillus* було проведено *in vitro* двома дифузійними методами: відтермінованого антагонізму та перпендикулярних штрихів. Виявлено два перспективних штами *B. subtilis* (Bs-5 і Bs-9) з високою або дуже високою антагоністичною активністю щодо індикаторних тестових культур мікроорганізмів; два перспективних штами *B. licheniformis* (Bfl-1, Bfl-4) із високим антагоністичним потенціалом дії на індикаторні тестові культури мікроорганізмів та один перспективний штам *B. coagulans* (Bcg-5) із проявом антагоністичних властивостей середнього рівня. Відібрані перспективні штами можуть бути використані для конструювання комплексного пробіотичного препарату «Біомагн».

Ключові слова: ПРОБІОТИЧНІ ПРЕПАРАТИ, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ, *BACILLUS SUBTILIS*, *BACILLUS LICHENIFORMIS*, *BACILLUS COAGULANS*, ТЕСТОВІ КУЛЬТУРИ, МЕТОД ВІДТЕРМІНОВАНОГО АНТАГОНІЗМУ, МЕТОД ПЕРПЕНДИКУЛЯРНИХ ШТРИХІВ.

STUDY *IN VITRO* OF ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS* ISOLATES AND SELECTION OF PROMISING PROBIOTIC STRAINS

O. M. Chechet, V. L. Kovalenko, O. I. Horbatiuk, O. S. Gaidei, O. L. Kravtsova,
V. O. Andriyashchuk, I. V. Musiets, D. O. Ordynska

State Research Institute for Laboratory Diagnostics and veterinary and sanitary examination,
30, Donetska str. Kyiv, 03151, Ukraine
o.chechet@vetlabresearch.gov.ua

The effectiveness of probiotic preparations is determined by the set of biological properties of the strains of cultures that are part of the probiotic, therefore, at the current stage of the development of biological antibacterial therapy, non-pathogenic probiotic spore-forming microorganisms, in particular bacteria of the genus *Bacillus*, are increasingly used to neutralize bacterial infections. The aim and tasks of the work were aimed at determining *in vitro* the level of antagonistic activity of isolates of *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* isolated from poultry to standard test cultures of gram-negative and gram-positive microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 and *Staphylococcus aureus* ATSS 6538 and the selection of the most promising strains for the construction of the complex probiotic preparation "Biomagn". 27 isolates of the genus *Bacillus* were studied, isolated from poultry from poultry farms in Ukraine and identified to the species *Bacillus subtilis* — 13 strains, *Bacillus licheniformis* — 6 strains, *Bacillus coagulans* — 8 strains. Research on the determination of the level of antagonistic activity of research isolates of the genus *Bacillus* was carried out *in vitro* by two diffusion methods: the method of timed antagonism and the method of perpendicular strokes. Two promising strains of *Bacillus subtilis* (Bs-5 and Bs-9) were identified with very high and high levels of antagonistic activity against the indicator test cultures of microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; two promising strains of *Bacillus licheniformis* (Bfl-1, Bfl-4) with a high antagonistic potential for action on indicator test cultures of microorganisms and one promising *Bacillus coagulans* (strain Bcg-5) with a medium level of antagonistic properties. The selected promising strains will be used for the construction of the complex probiotic preparation «Biomagn».

Keywords: PROBIOTIC PREPARATIONS, ANTAGONISTIC ACTIVITY, *BACILLUS SUBTILIS*, *BACILLUS LICHENIFORMIS*, *BACILLUS COAGULANS*, TEST CULTURES, METHOD OF DELAYED ANTAGONISM, METHOD OF PERPENDICULA

За останні роки отримана велика кількість даних щодо етіопатогенетичних механізмів розвитку бактеріальних інфекцій серед сільськогосподарської птиці. Оскільки у птахівничій галузі пріоритети подальшого розвитку надаються органічному птахівництву, у протимікробному лікуванні та профілактиці інфекцій у птиці спостерігається тенденція до застосування засобів біологічної терапії, зокрема пробіотиків. Відомо, що пробіотичні препарати володіють здатністю до корегування мікробіоценотичних порушень і змінених ланок метаболізму в шлунково-кишковому тракті птиці, оптимізації процесів адаптації та компенсації порушення функцій і проявляють десенсибілізуючі, морфокінетичні, антитоксикаційні, антиоксидантні, імуномодельючі та інші ефекти (Korniyuchuk et al., 2013; Kucheruk et al., 2017).

Пробіотичні препарати, виготовлені на основі лакто- і біфідобактерій, становлять основну частку на сучасному ринку біологічно активних препаратів, хоча більша їх частина застосовується для відновлення нормофлори шлунково-кишкового тракту (Ashra, Shah, 2014; Kucheruk et al., 2018; Romanovych, 2017).

Сучасний етап розвитку біологічної антибактеріальної терапії пов'язаний із вивченням методів знешкодження бактеріальних інфекцій завдяки використанню непатогенних пробіотичних спороутворюючих мікроорганізмів, серед яких особливий інтерес становлять бактерії роду *Bacillus*. Бацили є продуцентами широкого спектра біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків, що проявляють бактеріостатичний ефект щодо патогенних бактерій, сприяють посиленню неспецифічного і специфічного імунітету за допомогою активації макрофагів та комплексної запальної дії, чим забезпечують знешкодження патогенів. Позитивний вплив на фактори специфічного імунітету зумовлюється підвищенням рівня IgA та IgG. Бактерії роду *Bacillus* поліпшують кількісне зростання нормофлори шлунково-кишкового тракту завдяки продукції власних різноманітних ензимів (Khariv et al., 2017; Lutgendorff et al., 2009; Paliy, 2022).

Відомо, що ефективність пробіотичних препаратів визначається сукупністю біологічних властивостей штамів культур, які входять до їх складу, тому конструювання нових, дешевих, ефективних, зі змішаними популяціями різних пробіотичних мікроорганізмів у своєму складі, пробіотичних препаратів є актуальним питанням сьогодення (Khariv et al., 2017; Kotsymbas et al., 2017).

Метою роботи було визначити антагоністичну активність *in vitro* виділених від птиці ізолятів *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* і *Bacillus coagulans* щодо стандартних тестових культур грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів та відібрати найбільш перспективні штами для конструювання пробіотичного препарату «Біомагн».

Матеріали і методи. Дослідження проводили на базі лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології (ЛДЗБЕ) науково-дослідного мікробіологічного відділу (НДМВ) Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Для визначення рівня антагоністичної активності було досліджено 27 ізолятів роду *Bacillus*, виділених від птиці із птахогосподарств України. Із них ідентифікованих як вид *B. subtilis*, — 13 штамів (Bs-1, Bs-2, Bs-3, Bs-4, Bs-5, Bs-6, Bs-7, Bs-8, Bs-9, Bs-10, Bs-11, Bs-12 і Bs-13), *B. licheniformis* — 6 штамів (Bfl-1, Bfl-2, Bfl-3, Bfl-4, Bfl-5 і Bfl-6), *B. coagulans* — вісім штамів (Vcg-1, Vcg-2, Vcg-3, Vcg-4, Vcg-5, Vcg-6, Vcg-7 і Vcg-8).

Для проведення досліджень як індикаторні використовували грамнегативні тестові культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та грампозитивну тестову культуру *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 з колекції Музею культур тестових мікроорганізмів ЛДЗБЕ.

Есперименти з визначення рівня антагоністичної активності ізолятів роду *Bacillus* проводили *in vitro* в умовах лабораторії двома дифузійними методами: відтермінованого антагонізму та перпендикулярних штрихів.

Виявлення антагоністичної активності методом відтермінованого антагонізму дослідних культур проводили на чашках Петрі з 2,0 % м'ясо-пептонним агаром (МПА). Перед постановкою основного дослідження проводили підтитрування дослідних культур *Bacillus* за загальноприйнятою методикою послідовних розведень з метою одержання росту поодиноких колоній на засіяній бактеріальною суспензією поверхні МПА. Для забезпечення таких умов, зокрема для *B. subtilis*, використовували бактеріальну суспензію в концентрації 10^2 колонієутворюючих одиниць (КУО)/см³; для *B. licheniformis* і *B. coagulans* — по 10^3 (КУО)/см³ (Ivchenko, 2004).

Бактеріальні суспензії дослідних ізолятів у відповідних концентраціях висівали на чашки Петрі з МПА, інкубували за температури 37 ± 1 °C впродовж 24 год. Після цього у чашки Петрі з поодинокими колоніями дослідних ізолятів вносили 2–3 см³ хлороформу, щоби повністю покрити всю поверхню чашки з МПА, витримували впродовж 5 хв, зливали залишки хлороформу та підсушували поверхню МПА з макроколоніями в асептичних умовах упродовж 30 хв.

Паралельно проводили посіви добових тестових культур мікроорганізмів *P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 29630 та *S. aureus* ATCC 6538 на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та підрощували їх у термостаті за температури 37 ± 1 °C впродовж 6 год. Одержані тестові культури вносили в об'ємі по $0,1\text{ см}^3$ в пробірки з $5,0\text{ см}^3$ розплавленого і охолодженого до температури 45 ± 1 °C $0,7\%$ напіврідкого поживного агару (НРА). Суміш швидко і ретельно перемішували та розливали на підсушені чашки Петрі з колоніями дослідних мікроорганізмів роду *Bacillus*, ретельно розподіляючи по поверхні МПА. Після повного застигання суміші НРА з відповідною тестовою культурою, чашки переносили у термостат та інкубували за температури 37 ± 1 °C впродовж 24 год.

Кожний ізольований штам роду *Bacillus* був тричі досліджуваний з тестовими культурами бактерій. Визначали діаметр зон інгібування росту тестових бактерій або їх відсутність навколо макроколоній дослідних мікроорганізмів роду *Bacillus*. Антагоністичну активність дослідних штамів роду *Bacillus* вважали умовно низькою, якщо діаметр зони затримки росту коливався у межах від 7 до 14 мм; середнього рівня — в межах 14–26 мм; високою — в межах 27–36 мм та дуже високою — більше 36 мм за інтенсивного росту індикаторних тестових бактерій у відповідних контролях.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за (Oivyn, 1960).

Оскільки всі методи з визначення антагоністичних властивостей у пробіотичних культур є неточними, згідно з рекомендаціями дослідників, ми паралельно використали також і метод перпендикулярних штрихів для непрямого підтвердження попередніх результатів. Для цього на МПА у центр чашки Петрі за допомогою бактеріологічної петлі (діаметр 3 мм) наносили у вигляді краплі дослідні штами мікроорганізмів роду *Bacillus*, (кожний штам висівали на три чашки). Далі, починаючи від країв чашки з макроколонією дослідного штаму роду *Bacillus*, у напрямку до центру штрихом висівали відповідні добові тестові культури за допомогою бактеріологічної петлі (діаметром 5 мм), розміщуючи їх на певній відстані один від одного. Поряд з основним дослідом аналогічно виконували постановку контролів росту тестових бактерій. Чашки інкубували у термостаті за температури 37 ± 1 °C впродовж 24 год. Результати оцінювали візуально за довжиною штриха від краю чашки у напрямку до її центру та наявністю зон, вільних від росту тестових культур мікроорганізмів на цьому відрізьку площини. Після закінчення основних дослідів, з використанням двох дифузійних методів, було проведено порівняльний аналіз одержаних результатів для кожного дослідного штаму роду *Bacillus* та відібрані перспективні пробіотичні мікроорганізми для подальшої роботи. Методи: мікробіологічний, статистичний.

Результати й обговорення. Аналіз результатів досліджень з визначення антагоністичної активності виділених культур *B. subtilis* показав, що серед 13 штамів висока та дуже висока антагоністична активність дії на тестову культуру *E. coli* ATCC 25922 була притаманна чотирьом штамам: Bs-4, Bs-5, Bs-9, Bs-13, що становило $30,8\%$ від кількості досліджених ізолятів. Варто зауважити, що штами Bs-5 і Bs-9 проявляли дуже високу кілерну активність щодо тестових бактерій з діаметрами зон інгібування росту $37\pm 1,3$ і $39\pm 0,03$ мм відповідно. Решта штамів мали середній і низький рівні антагоністичних властивостей.

Результати досліджень шістьох штамів *B. licheniformis* стосовно виявлення кілерної активності щодо тестових бактерій *E. coli* ATCC 25922 засвідчили високий рівень у чотирьох штамів: Vfl-1, Vfl-3, Vfl-4 і Vfl-5, що становило $66,7\%$ від кількості досліджених штамів. Зокрема, у двох штамів Vfl-1 і Vfl-4 виявлений дуже високий рівень антагоністичної активності, що було підтверджено величною діаметрів зон інгібування росту кишкової палички в межах $33\pm 1,3$ та $38\pm 2,7$ мм, відповідно.

У досліджених штамів *B. coagulans* спостерігали незначну кілерну активність щодо тестових бактерій *E. coli* ATCC 25922. Високий рівень антагоністичної активності виявили лише в одного штама — Vcg-5 з діаметром зони затримки росту $27\pm 1,3$ мм за інтенсивного росту означеної тестової культури у контролі. Штами *Bacillus coagulans* Vcg-1, Vcg-4 і Vcg-8

не проявляли будь яких антагоністичних властивостей, що підтверджено повним заростанням макроколоній цих штамів бактеріями тестової культури *E. coli* ATCC 25922. У решти дослідних штамів *B. coagulans* підтверджено низьку та середню антагоністичну активність. Отже, дуже високий рівень антагоністичної активності щодо тестової культури *E. coli* ATCC 25922 був відмічений у двох штамів *B. subtilis* — Bs-5 і Bs-9; високий рівень антагоністичної активності встановлено у двох штамів *B. licheniformis* — Bfl-1 і Bfl-4 та в одного штаму *B. coagulans* — Bcg-5.

Результати досліджень *in vitro* антагоністичної активності досліджених бацил *B. subtilis* щодо *P. aeruginosa* ATCC 15442 показали високу кілерну дію двох штамів — Bs-5 і Bs-9, що було підтверджено величиною зон затримки росту в межах $27 \pm 1,7$ і $29 \pm 1,3$ відповідно, за суцільного росту тестової культури у контролі. Варто зауважити, що у 10-ти із 13-ти досліджених штамів *B. subtilis* антагоністична дія проявлялася на рівні середньої або низької інтенсивності. У штаму Bs-12 антагоністичні властивості не проявлялися взагалі, що підтверджувалося відсутністю зони інгібування росту тестової культури *P. aeruginosa* ATCC 15442 навколо макроколоній штаму за інтенсивного росту її у контролі (табл.).

Таблиця

Рівень антагоністичної активності ізолятів роду *Bacillus* щодо дії на грампозитивні і грамнегативні тестові бактерії, $M \pm m$, мм, $n=27$ ($n=13$; $n=6$, $n=8$)

№ п/п	Ізоляти роду <i>Bacillus</i>	Штами	Культури тестових мікроорганізмів							
			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29630		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
			Діаметр зони інгібування росту, мм	Рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності
1	<i>Bacillus subtilis</i>	Bs-1	22 $\pm 0,3$	середній	17 $\pm 0,3$	середній	37 $\pm 0,3$	дуже високий	15 $\pm 0,3$	середній
2	– «» –	Bs-2	19 $\pm 0,3$	середній	22 $\pm 0,7$	середній	22 $\pm 1,7$	середній	18 $\pm 0,7$	середній
3	– «» –	Bs-3	21 $\pm 0,7$	середній	19 $\pm 0,3$	середній	19 $\pm 2,3$	середній	22 $\pm 1,7$	середній
4	– «» –	Bs-4	33 $\pm 0,3$	високий	16 $\pm 0,3$	середній	28 $\pm 1,7$	високий	13 $\pm 1,7$	низький
5	– «» –	Bs-5	37 $\pm 1,3$	дуже високий	27 $\pm 1,7$	високий	38 $\pm 1,7$	дуже високий	35 $\pm 0,7$	високий
6	– «» –	Bs-6	22 $\pm 1,7$	середній	14 $\pm 2,3$	середній	31 $\pm 0,3$	високий	16 $\pm 1,7$	середній
7	– «» –	Bs-7	20 $\pm 0,3$	середній	17 $\pm 1,7$	середній	23 $\pm 0,7$	середній	21 $\pm 1,3$	середній
8	– «» –	Bs-8	18 $\pm 1,7$	середній	10 $\pm 0,3$	низький	19 $\pm 0,7$	середній	26 $\pm 0,3$	середній
9	– «» –	Bs-9	39 $\pm 0,13$	дуже високий	29 $\pm 1,3$	високий	37 $\pm 1,7$	дуже високий	39 $\pm 0,3$	дуже високий
10	– «» –	Bs-10	20 $\pm 0,17$	середній	20 $\pm 0,3$	середній	17 $\pm 0,3$	середній	33 $\pm 0,3$	високий
11	– «» –	Bs-11	13 $\pm 0,7$	низький	19 $\pm 0,13$	середній	21 $\pm 0,3$	середній	29 $\pm 0,3$	високий
12	– «» –	Bs-12	10 $\pm 0,3$	низький	0	не чутливий	26 $\pm 1,7$	середній	13 $\pm 0,7$	низький

13	– «» –	Bs-13	28 ±1,7	високий	18 ±0,3	середній	15 ±1,3	середній	0	не чутливий
1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bfl-1	33 ±1,3	високий	32± 0,17	високий	32 ±1,7	високий	36 ±1,7	високий
2	– «» –	Bfl-2	22 ±1,3	середній	30 ±0,3	високий	27 ±0,7	високий	32 ±1,7	високий
3	– «» –	Bfl-3	20 ±0,7	середній	24 ±0,7	середній	21 ±0,3	середній	27 ±0,3	високий
4	– «» –	Bfl-4	38 ±0,7	дуже високий	36 ±2,3	високий	38 ±0,3	дуже високий	37 ±0,3	дуже високий
5	– «» –	Bfl-5	31 ±0,3	Високий	21 ±1,7	середній	31 ±0,7	високий	30 ±0,7	високий
6	– «» –	Bfl-6	19 ±0,7	Середній	15 ±0,7	середній	20 ±1,7	середній	33 ±0,3	високий
1	<i>Bacillus coagulans</i>	Vcg-1	0	не чутливий	16 ±0,3	середній	26 ±1,7	середній	0	не чутливий
2	– «» –	Vcg-2	14 ±0,3	Середній	19 ±0,7	середній	20 ±0,3	середній	11 ±0,7	низький
3	– «» –	Vcg-3	7 ±0,7	Низький	12 ±0,7	низький	22 ±0,7	середній	13 ±0,3	низький
4	– «» –	Vcg-4	0	не чутливий	0	не чутливий	25 ±1,7	середній	19 ±1,7	середній
5	– «» –	Vcg-5	27 ±1,3	Середній	29 ±1,3	високий	37 ±2,3	дуже високий	23 ±0,3	середній
6	– «» –	Vcg-6	11 ±0,7	Низький	14 ±1,7	середній average	17 ±0,7	середній average	21 ±0,7	середній
7	– «» –	Vcg-7	5 ±1,3	Низький	7 ±0,7	низький	21 ±0,3	середній	17 ±0,7	середній
8	– «» –	Vcg-8	0	не чутливий	8 ±0,7	низький	13 ±0,3	низький	0	не чутливий

Стосовно кілерної дії штамів *B. licheniformis* на індикаторні тестові бактерії псевдомонади, то високу і дуже високу пробіотичну здатність було виявлено у трьох штамів — Bfl-1, Bfl-2, Bfl-4, про що свідчила величина діаметрів зон затримки росту *P. aeruginosa* ATCC 15442 навколо макроколоній дослідного штаму в діапазонах 32±0,17; 30±0,3 і 36±0,7 мм відповідно.

Результати досліджень ізолятів *B. coagulans* у штаму Vcg-5 виявили високі кілерні властивості щодо тестових бактерій *P. aeruginosa* ATCC 15442 із зоною інгібування росту 29±1,3 мм за інтенсивного росту індикаторної культури у контролі. Штам Vcg-4 не проявляв антагоністичних властивостей, про що свідчила відсутність зон затримки росту, а решта штамів *B. coagulans* володіли антагоністичними властивостями середнього та низького рівня.

Отже, серед досліджених ізолятів *B. subtilis* нами як перспективні пробіотичні культури виділено штами Bs-5 і Bs-9; серед *B. licheniformis* — штами Bfl-1 і Bfl-4; серед *B. coagulans* — штам Vcg-5, яким був притаманний високий рівень антагоністичної активності щодо індикаторної тестової культури *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Аналіз результатів *in vitro* ізолятів *B. subtilis* на життєдіяльність тестової культури *S. typhimurium* ATCC 29630 показав дуже високий і високий рівень антагоністичної активності у п'яти штамів: Bs-1 (діаметр зони інгібування росту 37±0,3 мм), Bs-4 (28±1,7 мм), Bs-5 (38±1,7 мм), Bs-6 (31±0,3 мм) і Bs-9 (37±1,7 мм), відповідно, що становило 38,5 % серед досліджених штамів. У решти досліджених культур *B. subtilis* були підтверджені пробіотичні властивості на рівні середніх показників.

Результати досліджень виявили, що культури *B. licheniformis* були досить антагоністично різними за рівнем активності, оскільки 4 із 6-и досліджених штамів проявляли дуже високу та високу антагоністичну дію на індикаторні тестові бактерії *S. typhimurium* ATCC 29630, зокрема штами Bfl-1 (діаметр зони інгібування росту 37±0,3 мм), Bfl-2

($27\pm 0,7$ мм), Vfl-4 ($38\pm 0,3$ мм) і Vfl-5 ($31\pm 0,7$ мм) відповідно. Інші штами *B. licheniformis* мали середні рівні антагоністичної активності щодо тестової культури сальмонел.

Серед восьми досліджених ізолятів *B. coagulans* середній рівень антагоністичної активності мали сім штамів. Одному штаму Vcg-5 були притаманні дуже високі показники антагоністичної активності з діаметром зони затримки росту $37\pm 2,3$ мм щодо тестової культури *S. typhimurium* ATCC 29630 за її інтенсивного росту у контролі.

Отже, нами було виявлено *in vitro* дуже високу та високу антагоністичну активність дії на тестову культуру *S. typhimurium* ATCC 29630 серед досліджених штамів *B. subtilis* Bs-1, Bs-4, Bs-5, Bs-6 і Bs-9; серед *B. licheniformis* у штамів Vfl-1, Vfl-2, Vfl-4 і Vfl-5 та у штаму *B. coagulans* Vcg-5.

Високу або дуже високу антагоністичну активність *in vitro* ізолятів *B. subtilis* щодо дії на грампозитивні тестові бактерії *S. aureus* ATCC 6538 було виявлено у штамів Bs-5 (діаметр зони інгібування росту $35\pm 0,3$ мм), Bs-9 ($39\pm 0,3$ мм), Bs-10 ($33\pm 0,3$ мм), Bs-11 ($29\pm 0,3$ мм) відповідно, які становили 30,8 % від кількості досліджених штамів за інтенсивного росту тестової культури у контролі. У штаму *B. subtilis* Bs-13 зон інгібування росту не було виявлено, що свідчило про відсутність пробіотичних властивостей. Всім іншим дослідженим штамам *B. subtilis* була притаманна низька і середня антагоністична активність.

Варто зазначити, результатами досліджень було встановлено, що в усіх штамів *B. licheniformis* величина діаметра зони інгібування росту тестової культури вказувала на дуже високу та високу антагоністичну активність. Зокрема, у штамів *B. licheniformis* Vfl-1 (діаметр зони інгібування росту $36\pm 1,7$ мм), Vfl-2 ($32\pm 1,7$ мм), Vfl-3 ($27\pm 0,3$ мм), Vfl-4 ($37\pm 0,3$ мм), Vfl-5 ($30\pm 0,7$ мм), Vfl-6 ($33\pm 0,3$ мм) відповідно, що становило 100,0 % досліджених культур.

Серед восьми ізолятів *B. coagulans* чотири штами мали середній рівень антагоністичної активності, зокрема, Vcg-4 ($19\pm 0,3$ мм діаметр зони інгібування росту), Vcg-5 ($23\pm 1,3$ мм), Vcg-6 ($21\pm 0,7$ мм) і Vcg-7 ($17\pm 0,7$ мм) відповідно, що становило 50,0 % від кількості досліджених штамів. Штами Vcg-1 і Vcg-8 *B. coagulans* не мали антагоністичних властивостей, про що свідчила відсутність зони затримки росту щодо індикаторних тестових бактерій *S. aureus* ATCC 6538. Інші штами *B. coagulans* проявляли низький рівень кілерної дії на означену тестову культуру мікроорганізмів.

Отже, нами виявлено дуже високу та високу антагоністичну активність щодо антагоністичної дії *in vitro* на тестову культуру *S. aureus* ATCC 6538 серед ізолятів *B. subtilis* (штами Bs-5, Bs-9, Bs-10 і Bs-11) та *B. licheniformis* (штами Vfl-1, Vfl-2, Vfl-3, Vfl-4, Vfl-5 і Vfl-6). Серед ізолятів *B. coagulans* середній рівень антагоністичної властивості мали штами Vcg-4, Vcg-5, Vcg-6 і Vcg-7, що дає підстави вважати їх перспективними пробіотичними штамами.

За візуально визначеною довжиною штриха росту тестових бактерій *E. coli* ATCC 25922 була підтверджена антагоністична активність ізолятів *Bacillus subtilis* штамів Bs-4, Bs-5 і Bs-9; *Bacillus licheniformis* штамів Vfl-1, Vfl-4 і Vfl-5; *Bacillus coagulans* штаму Vcg-5.

За візуальної оцінки різної довжини штрихів росту бактерій тестової культури *P. aeruginosa* ATCC 15442 в напрямку до центру чашки з ізолятами *B. subtilis*, непрямим способом підтверджено антагоністичну активність у штамів Bs-5, Bs-9; з ізолятами *B. licheniformis* — у штамів Vfl-1 і Vfl-4; з ізолятами *B. coagulans* — у штаму Vcg-5.

За візуального вивчення довжини штрихів росту бактерій *S. typhimurium* ATCC 29630 від країв чашки у напрямку до центру чашки з ізолятами *B. subtilis* Bs-1, Bs-4, Bs-5, Bs-6, Bs-9 були виявлені достатньо короткі відрізки їх росту, що стало непрямим підтвердженням антагоністичної активності дослідних ізолятів стосовно означеного тестового мікроорганізму. Серед ізолятів *B. licheniformis* непрямим способом підтверджені антагоністичні властивості у штамів Vfl-1, Vfl-2, Vfl-4, Vfl-5 і Vfl-6. Варто зауважити, що антагонізм дослідних штамів *B. coagulans* щодо впливу на індикаторну тестову культуру *S. typhimurium* ATCC 29630 був слабо вираженим, оскільки візуально визначені довжини штрихів росту тестових бактерій

були довгими із досить обмеженою зоною інгібування росту між штрихом росту культури та місцем дифузії дослідних штамів бацил.

Результати низки науковців показали, що пробіотичні препарати за ефективністю не поступаються певним антибіотикам та хіміотерапевтичним засобам, не пригнічуючи при цьому росту нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, не мають негативного впливу на продукцію птахівництва і є екологічно безпечними (Garda et al., 2014; Kaminska et al., 2009).

Вчені акцентують увагу на тому, що найбільш перспективними пробіотиками є препарати, які створені на основі мікроорганізмів, що належать до родів *Bacillus*, *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*, саме ті види, які є складовою частиною мікробіоценозів ШКТ тварин та птиці (Criscio et al., 2010; Pitino et al., 2010). Наші дослідження проходили у такому ж напрямку, оскільки для нас це представляє науковий і практичний інтерес.

Дослідники вважають, що на перших етапах досліджень пробіотичних штамів мікроорганізмів здебільшого потрібно застосовувати методи *in vitro*, які дозволяють виявити і відсіяти неактивні та малоактивні культури. Зокрема, рекомендують метод перпендикулярних штрихів, адже на одній чашці Петрі з МПА є можливість дослідити один пробіотичний штам з кількома культурами тестових мікроорганізмів одночасно. Ми використали такі методи, оскільки ми розробляємо новий пробіотичний препарат. Низка вчених вважають ефективним методом виявлення антагоністичної активності пробіотичних штамів метод відтермінованого антагонізму (або метод агарових шарів). І хоча згаданий метод є дуже трудомістким, проте дозволяє одержати чіткі межі діаметрів інгібування росту відповідних тестових культур дослідними пробіотичними штамми мікроорганізмів (Garda et al., 2014; Markowiak, Śliżewska, 2018).

Нами застосовані одночасно вищеозначені методи для одержання більш точних даних та проведено аналіз, який в обох випадках підтверджував результати проведених досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Штами Bs-5 і Bs-9 із 13 ізолятів *B. subtilis*, що проявляли високу або дуже високу антагоністичну активність *in vitro* щодо індикаторних тестових культур мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 29630 та *S. aureus* ATCC 6538, були відібрані як перспективні для конструювання пробіотичного препарату «Біомагн».

2. Виявлено два штами Vfl-1 та Vfl-4 із 6 ізолятів *B. licheniformis*, виділених від птиці, що мали високий антагоністичний потенціал дії на всі тестові культури *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 29630 та *S. aureus* ATCC 6538, які були відібрані як перспективні для конструювання пробіотику «Біомагн».

3. Встановлено, що із восьми ізолятів *B. coagulans* тільки штам Vcg-5 мав середній рівень антагоністичних властивостей до усіх індикаторних тестових мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhimurium* ATCC 29630 та *S. aureus* ATCC 6538 та запропонований нами для конструювання пробіотичного препарату «Біомагн».

Перспективи досліджень будуть направлені на конструювання пробіотичного препарату «Біомагн» на основі виявлених перспективних штамів мікроорганізмів.

References

- Ashra, F.R. & Shah, N.P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 54(7): 938–956. doi:10.1080/10408398.2011.619671.
- Criscio, T. Di, Fratianni, A., Mignogna, R. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic and synbiotic ice creams. *J. Dairy Sci.* 93(10): 4555–4564.

Garda, S.O., Danylenko, S.G., Litvinov, G.S. (2014). Biotechnological aspects of microflora analysis of poultry. *Biotechnologia Acta*. 7(4): 25–34. Access mode: http://nbuv.gov.ua/UJRN/biot_2014_7_4_4. [in Ukrainian].

Ivchenko, V.M. (2004). Dovidnyk sanitarno-mikrobiolohichnykh metodiv doslidzhennia kharchovykh produktiv ta ob'ektiv dovkillia. Bila Tserkva, 242. [in Ukrainian].

Kaminska, M.V., Kolysnik, G.V., Kulaj, U.V., Boretska, N.I., Tenacious, N.I., Gural, S.V., Nebilovsky, Y.V., Nechay, G.I. (2009). Changes in the composition of intestinal microflora of Japanese quail when using probiotic supplements. *Scientific and technical bulletin*. 10(2): 270–274. [in Ukrainian].

Khariv, M., Gutyj, B., Ohorodnyk, N., Vishchur, O., Khariv, I., Solovodzinska, I., Mudrak, D., Grymak, C., Bodnar, P. (2017). Activity of the T- and B-system of the cell immunity of animals under conditions of oxidation stress and effects of the liposomal drug. *Ukrainian Journal of Ecology*. 7(4): 536–541. doi:10.15421/2017_157.

Kotsyumbas, G., Kostynjuk, A., Mysiv, O., Fedyk, Yu. (2017). Histological, histochemical characteristics of duodenal intestine of hen-broilers for feed feeding with high content of probiotic supplements. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S. Z. Gzhytskyj*. 19(77), 71–75. doi:10.15421/nvlvet7717. [in Ukrainian].

Korniychuk, O.P., Bureva, L.M., Lavryk, G.S., Ferentz, N.M., Maksimiv, N.I. (2013). Antimicrobial activity of Biosporin: in vitro studies. *Modern pediatrics*. 6(54): 1–4. Regular access: [https://biosporin.com.ua > uploads](https://biosporin.com.ua/uploads). [in Ukrainian].

Kucheruk, M.D., Zasekin, D.A., Dymko, R.O., Shcherbina, O.A. (2017). Sanitary and hygienic conditions of keeping poultry under organic farming as a factor of productivity. *Bioresources and nature use of Ukraine*. 9: 5–6. Access mode: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Bio/article/view/9605>. [in Ukrainian].

Kucheruk, M.D., Zasekin, D.A., Dymko, R.O. (2018). Microbiological and sanitary-hygienic significance of intestinal eubiosis of productive animals. *Ukrainian Journal of Ecology*. 8(2): 287–293 doi: 10.15421/2018_340.

Lutgendorff, F., Nijmeijer, R.M., Sandström, P.A., Trulsson, L.M., Magnusson, K.E., Timmerman, H.M., van Minnen, L.P., Rijkers, G.T., Gooszen, H.G., Akkermans, L.M. (2009). Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS ONE*. 4: 4512. doi: 10.1371/journal.pone.0004512.

Markowiak, P. & Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut. Pathog.* 10(21): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.

Oivyn, I.A. (1960). Statistical processing of the results of experimental studies. *Pathological physiology and experimental therapy*. 4: 396–401.

Paliy, A. & Paliy, A. (2022). Modern approaches to the use of probiotics in poultry farming. *Poultry breeding*. Ua. 3-4: 51–52. [in Ukrainian].

Pitino, I., Randazzo, C.L., Curto, ALo. (2010). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* strains in the upper gastrointestinal tract. *Food Microbiol.* 27(8): 1121–1127.

Romanovych, M.M. (2017). Dynamics of humoral protective factors in broiler chickens under the conditions of the use of probiotic preparations. *Scientific Bulletin of S.Z. Gzhitsky Lviv NUVMBT*. 19(78): 264–267. [in Ukrainian].