

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ З КИШЕЧНИКУ ЗДОРОВИХ КУРЕЙ

І. С. Семен

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок

*У статті подані результати досліджень з визначення антагоністичної активності мікроорганізмів роду *Lactobacillus*, виділених з кишкового тракту здорових курей, до умовно-патогенних та патогенних тест-штамів мікробів. Дослідження проводились з метою селекції антагоністично-активних мікроорганізмів і конструювання пробіотичного препарату, що здатний ефективно впливати на нормофлору кишкового тракту птиці та проявляти антагонізм до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.*

Пробіотичні препарати, які застосовуються у птахівництві, використовують для профілактики та лікування захворювань травного тракту, для стимулювання неспецифічного імунітету, лікування дисбактеріозів шлункового тракту, що виникають через зміну складу кормів, при недотриманні правил і режимів годівлі та при технологічних стресах. Доведено ефективність їх використання для відновлення нормальної мікрофлори кишкового тракту після лікування антибіотиками, антибактеріальними хіміотерапевтичними засобами. Крім цього, пробіотики використовуються для підвищення засвоєння кормів, а також для стимулювання росту птиці та підвищення її продуктивності [1].

На сучасному етапі розвитку тваринництва та птахівництва постійно зростають вимоги щодо якості та ефективності застосування пробіотиків. Досвід конструювання і широкого впровадження пробіотиків з мікроорганізмами різних таксономічних груп підтвердив їх виражену лікувальну — профілактичну дію [2]. До складу пробіотичних препаратів може входити один або декілька штамів як одного виду мікроорганізмів, так і різних видів, що дає можливість розширити спектр їх активності. З цією метою найчастіше використовують молочнокислі бактерії, біфідобактерії, штами кишкової палички, бактерій роду *Bacillus* та ін. [3].

Особливої уваги заслуговує група мікроорганізмів, що відносяться до роду *Lactobacillus*. Лактобацили мають високу здатність до колонізації епітелію травного тракту, що є захисним бар'єром на шляху проникнення патогенної мікрофлори і, таким чином, забезпечують стабілізацію нормального складу мікробіоценозу кишкового тракту птиці [4].

Механізм дії пробіотиків на основі лактобацил є багатосторонній. Це і антагоністична активність, що включає продукування різного роду біологічноактивних речовин, в тому числі антибіотикоподібних речовин. Лактобацили утворюють значну кількість оцтової, мурашиної, молочної кислот, перексиду водню, інгібуючі властивості яких добре відомі. У процесі метаболізму багато з них закисляють рН до 4,5 і нище. Самі лактобацили толерантні до низького рН, але його зниження до значення 4,5 є бактеріоцидним для ряду штамів *Micrococcus* sp. і *B. cereus* [5].

Перспективним напрямком удосконалення пробіотиків є розробка комплексних препаратів, до складу яких входять різні види бактеріальних культур, які взаємодоповнюють один одного за специфічною активністю та впливом на мікроорганізми. Штами, які використовують для створення біопрепаратів, повинні вирізнятися унікальним поєднанням якостей: вибірково пригнічувати ріст патогенних культур, мати високу ферментативну, синтетичну і метаболічну активність, стимулювати імунобіологічні системи організму [6].

Метою наших досліджень було виділення та ідентифікація з кишечника здорових курей антагоністичноактивних мікроорганізмів роду *Lactobacillus*, з подальшим конструюванням на їх основі комплексного пробіотика для потреб птахівництва.

Матеріали і методи. Для проведення досліджень, від здорових курей, віком 86 діб було відібрано проби вмістимого з прямого відділу кишечника. Виділення та ідентифікацію мікроорганізмів проводили за багатоступеневою системою, яка включала виділення чистої культури, вивчення культуральних, тинкторіальних морфологічних та біохімічних властивостей культур.

Ідентифікацію лактобактерій проводили згідно з визначником Бергі [7]. У результаті проведених досліджень з 14 культур роду *Lactobacillus*, що були виділені з кишечника здорових курей, 7 культур належали до виду *L. lactis*, 3 культури — до виду *L. casei*, 4 культури — до виду *L. brevis*.

Для визначення антагоністичної активності бактерії роду *Lactobacillus* застосовували метод дифузії в агар з використанням луночок. За зонами затримання росту всі мікроби-антагоністи кваліфікували як: низькоактивні — із зоною затримання росту 0–9,0 мм, середньоактивні — 10,0–19,0 мм та високоактивні — із зоною затримання росту — 20,0–25,0 мм і більше.

Результати та обговорення. Антагоністичну активність виділених мікроорганізмів визначали до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори: *E. coli*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Pr. mirabilis*, *Ps. aeruginosa*, *C. albicans* та *S. typhimurium*.

Результати визначення антагоністичної активності бактерій *Lactobacillus lactis* подано у таблиці 1.

Таблиця 1

**Антагоністична активність штамів *Lactobacillus lactis*
(діаметр зон затримання росту, мм), (M±m, n=5)**

№ шт	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>C. albicans</i>
1	19,0±1,0	19,4±0,96	24,0±1,58	16,6±1,14	18,8±0,75	0	0
3	20,2±1,09	16,0±0,70	17,8±0,83	12,8±0,83	0	04,6±0,54	0
3	20,2±1,09	16,0±0,70	17,8±0,83	12,8±0,83	0	04,6±0,54	0
9	17,8±0,83	16,0±1,0	18,0±1,0	0	0	14,0±1,22	14,8±0,8
10	20,8±1,92	22,8±0,±0,83	25,0±1,0	0	21,0±0,7	17,6±0,54	0
9	17,8±0,83	16,0±1,0	18,0±1,0	0	0	14,0±1,22	14,8±0,8
14	20,8±1,92	21,4±1,54	21,8±1,09	0	22,2±1,48	18,0±1,0	0

Як видно з даних, наведених у таблиці 1, штами *Lactobacillus lactis* № 10, 14 проявляли високу антагоністичну активність, зони затримання росту коливались у межах 20,0–25,0 мм; середньоактивними були штами № 1, 3, 9, 12 зони затримання росту коливались в межах 10,0–19,0 мм; низькоактивним виявився один штама — № 8. Таким чином, з 7 виділених штамів *L. lactis* — 2 штами (28,0 %) проявили високу антагоністичну активність, 4 штами (57,1 %) проявили середню антагоністичну активність та 1 виділений штама (14,3 %) виявився низькоактивним.

Згідно із запропонованою класифікацією з визначення ступеня антагоністичної активності було встановлено відсоток антагоністичноактивних *L. lactis*. Результати досліджень подані в таблиці 2.

**Відсоток антагоністично-активних штамів *Lactobacillus lactis*
до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори**

Види мікроорганізмів	Кількість штамів					
	Низькоактивні		Середньоактивні		Високоактивні	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i>	1	14,28	2	28,57	3	42,85
<i>St. aureus</i>	2	28,57	3	42,85	2	28,57
<i>St. epidermidis</i>	–	–	4	57,15	3	42,85
<i>Ps. aeruginosa</i>	5	71,42	2	28,57	–	–
<i>S. typhimurium</i>	4	57,15	1	14,28	2	28,57
<i>Pr. mirabilis</i>	3	42,85	4	57,15	–	–
<i>C. albicans</i>	5	71,42	2	28,57	–	–

Результати досліджень, що подані в таблиці 2 свідчать про те, що найбільший відсоток високоактивних штамів *L. lactis* був до *E. coli* та *St. epidermidis* — по 2 штами (42,85 %), до *St. aureus* та *S. typhimurium* — по 2 штами (28,57 %), середньоактивними штами *L. lactis* були до *St. epidermidis* та *Pr. mirabilis* — по 4 штами (57,15 %), до *St. aureus* — 3 штами (42,85 %). Штами *L. lactis* виявились низькоактивними до *Ps. aeruginosa* та *C. albicans* — по 5 штамів (71,42 %), до *S. typhimurium* — 4 штами (57,15 %).

При визначенні антагоністичної активності *L. brevis*, виділених з кишечника здорових курей, ми отримали наступні дані, які подані в таблиці 3.

Таблиця 3

**Антагоністична активність штамів *Lactobacillus brevis*, (діаметр зон затримання росту, мм),
(M±m, n=5)**

№ шт	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>C. albicans</i>
2	14,2±0,8	18,8±0,83	17,8±1,09	15,0±1,22	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	20,8±1,9	21,8±0,83	24,4±0,54	20,8±1,92	16,2±0,83	14,8±9,8	0
13	14,2±0,3	15,0±1,22	0	14,0±0,89	12,2±0,83	0	0

Аналіз даних таблиці 3 свідчить про те, що з 4 виділених штамів *L. brevis* — штам № 6 (25 %) проявив високу антагоністичну активність. Середню антагоністичну активність проявили штами № 2, 13 (50 %), зони затримання росту коливались в межах 10,0–19,0 мм. Штам № 5 (25 %) не проявляв антагоністичну активність до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори.

Згідно з запропонованою кваліфікацією антагоністичної активності мікроорганізмів, нами було встановлено відсоток активності *L. brevis* до досліджуваних тест-штамів.

Аналіз даних таблиці 4 свідчить про те, що високоактивними були штами *L. brevis* до *E. coli*, *St. aureus*, *St. epidermidis* та *Ps. aeruginosa* по 1 штаму (25 %), середньоактивними до *Ps. aeruginosa*, *St. aureus* та *S. typhimurium* — по 2 штами (50 %), низькоактивними — до *C. albicans* — 4 штами (100 %), *Pr. mirabilis* — 3 штами (75 %).

**Відсоток антагоністично-активних штамів *Lactobacillus brevis*,
до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори**

Види мікроорганізмів	Кількість штамів					
	Низькоактивні		Середньоактивні		Високоактивні	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i>	1	25	2	50	1	25
<i>St. aureus</i>	1	25	2	50	1	25
<i>St. epidermidis</i>	2	50	1	25	1	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	1	25	2	50	1	25
<i>S. typhimurium</i>	2	50	2	50	–	–
<i>Pr. mirabilis</i>	3	75	1	25	–	–
<i>C. albicans</i>	4	100				

При визначенні антагоністичної активності *L. casei*, виділених із кишечника здорових курей, ми отримали наступні дані, які подані в таблиці 5.

Таблиця 5

**Антагоністична активність штамів *Lactobacillus casei*,
(діаметр зон затримання росту, мм), (M±m, n=5)**

№ шт.	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Pr. mirabilis</i>	<i>C. albicans</i>
4	19,0±0,70	17,2±0,83	19,2±0,83	0	0	0	14,21,3
7	19,8±1,09	23,8±0,83	24,0±0,70	18,2±0,83	22,0±1,0	15,6±0,54	-
11	0	0	0	0	0	0	0

При аналізі даних таблиці 5 видно, що з 3 трьох виділених штамів *L. casei* — 2 штами № 4, 7 (66,7 %) проявили антагонізм до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори. Штам № 7 виявився високоактивним, зони затримання росту тест-культур коливались у межах 20,0–24,0 мм, а штам № 4 проявив середню активність до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори, зони затримання росту становили 14,0–19,0 мм. Штам № 11 виявився низько-активним.

Відсоток активності *L. casei* до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори подано в таблиці 6.

Аналіз даних таблиці 6 свідчить про те, що високоактивними були штами *L. casei* до *E. coli*, *St. aureus*, *St. epidermidis* та *S. typhimurium* — по 1 штаму (33,3 %), низькоактивними до *Ps. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *Pr. mirabilis* та *C. albicans* — по 2 штами (66,7 %).

Таблиця 6

**Відсоток антагоністично-активних штамів *Lactobacillus casei*
до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори**

Види мікроорганізмів	Кількість штамів					
	Низькоактивні		Середньоактивні		Високоактивні	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>E. coli</i>	1	33,3	1	33,3	1	33,3
<i>St. aureus</i>	1	33,3	1	33,3	1	33,3
<i>St. epidermidis</i>	1	33,3	1	33,3	1	33,3
<i>Ps. aeruginosa</i>	2	66,7	1	33,3	–	–
<i>S. typhimurium</i>	2	66,7	–	–	1	33,3
<i>Pr. mirabilis</i>	2	66,7	1	33,3	–	–
<i>C. albicans</i>	2	66,7	1	33,3	–	–

Зведені дані, про визначення антагоністичної активності виділених штамів мікроорганізмів роду *Lactobacillus* до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори подано у таблиці № 7.

Таблиця 7

**Антагоністична активність мікроорганізмів роду
Lactobacillus (14 штамів)**

№ п/п	Мікроорганізми	Всього штамів	Високоактивні і штами	%	Середньоактивні штами	%	Низькоактивні	%
1	<i>L. lactis</i>	7	2 (№ 10,14)	28,6	4 (№ 1,3,9,12)	57,1	1 (№ 8)	14,3
2	<i>L. brevis</i>	4	1(№ 6)	25,0	2 (№ 8,13)	50,0	1 (№ 5)	25,0
3	<i>L. casei</i>	3	1 (№ 7)	33,3	1 (№ 4)	33,3	1 (№ 11)	33,0

Аналіз даних таблиці 7 свідчить про те, що з 14 виділених штамів роду *Lactobacillus* високоактивними були — 4 штами (27,4 %), середньоактивними — 7 штамів (50 %), низькоактивними — 3 штами (21,6 %).

Отже, в результаті проведених досліджень, ми встановили, що виділені з кишечника здорових курей, культури роду *Lactobacillus*, проявляють високу антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів і є перспективними для конструювання пробіотика, що буде застосовуватись для потреб птахівництва.

В И С Н О В К И

1. Встановлено антагоністичну активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з кишечника здорових курей, до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори.

2. Всього з 14 виділених лактобактерій антагоністичні властивості проявило 11 культур (78,5 %) виділених лактобактерій. Високу антагоністичну активність до умовно-патогенної та патогенної мікрофлори було встановлено у 28,5 % виділених штамів та середню антагоністичну активність встановлено у 50 % виділених лактобактерій, низькоактивні становили 21,5 %.

**ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTOBACTERIA SELECTED
FROM INTESTINE OF HEALTHY HENS**

I. S. Semen

S U M M A R Y

The results of researches determining antagonistic activity of the microorganisms of *Lactobacillus* family, selected from the bowels of healthy hens, to the conditional-pathogenic and pathogenic test-strains of microbes are given in this article. Researches were conducted on purpose to select antagonistic active microorganisms and construct probiotic preparation, able to influence effectively the normoflora of poultry bowels and show antagonism to the pathogenic and conditionally-pathogenic microorganisms.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Имагулов Ш., Игнатова Г., Первова А.* Целобактерин — пробиотик + фермент // Комбікорма. — 2004. — № 5. — С. 48–50.
2. *Коцюмбас І. Я., Рожко М. С., Кушнір І. М.* Застосування пробіотиків у ветеринарній медицині // Ветеринарна медицина України. — 2003. — № 10. — С. 15–17.
3. Мікробні біотехнології у сільському господарстві / В. В. Смирнов, В. С. Підгорський, Г. О. Іутинська та ін. / Вісник аграрної науки. — 2002. — № 4. — С. 5–9.
4. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов / В. В. Смирнов, Н. К. Коваленко, В. С. Подгорский., И. Б. Сорокулова / Мікробіологічний журнал. — 2002. Т. 64. — № 3. — С. 62–77.
5. *Тараканов Б. В.* Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных // Ветеринария. — 2000. — № 1. — С. 47–54.
6. *Стегній Б. Т., Гужвинська С. О.* Пробиотики у тваринництві // Вісник аграрної науки. — 2005. — № 2. — С. 26–29.
7. *Хоулта Дж.* Краткий определитель Берги. — Москва. — 1980 — С. 495.