

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ШТАМІВ ПРОБІОТИКІВ В СИСТЕМІ РОЗРОБКИ НОВОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ВТОРИННИХ ІМУНОДЕФІЦИТІВ У ТВАРИН

Г. А. Завірюха, к.с.-г.н.,

Т. Б. Васильєва, науковий співробітник

Центр інноваційних біотехнологій, м.Київ

В статті представлені результати дослідження культур пробіотиків *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17*. Надані основні характеристики та визначена придатність досліджених штамів для культивування на молоці при конструюванні композицій пробіотиків. Експериментально доведено відсутність антагоністичної дії мікробів *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17* до музейних штамів тест-культур та вірулентних штамів *S. thyphisuis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. choleraesuis* Кіровоград, *P. multocida Z-84*, *S. thyphimurium*, *E. coli M-17*, *E. coli BM-1*, *E. coli IBM-2*.

Ключеві слова: пробіотики, штами, розробка, біотехнологія, препарати.

Лікування вторинних імунодефіцитів є актуальною проблемою як для гуманної медицини, так і для ветеринарної. Захворювання виникає як наслідок незбалансованого харчування, розвитку злоякісних пухлин, інфекційних захворювань, впливу іонізуючої радіації, цитотоксичних препаратів, суперантигенів, аутоімунних захворювань та інших патологічних станів, наприклад, серповиднокліткової анемії, уремії, тощо.

Відзначено, що у хворих з імунодефіцитами відносно часто виявляють аутоантитіла і аутоімунні хвороби [1]. До найбільш важких форм вторинного імунодефіциту відносяться ВІЛ-інфекція у людей, злоякісні процеси (рак, пухлинна хвороба) як у людей так і тварин.

Захистити людину і тварину від патогенних бактерій та інших екзогенних факторів агресії може асоціація мікроорганізмів, яка постійно заселяє травну систему і створює неспецифічний бар'єр захисту [2,3,4].

В сучасних умовах розвитку сільськогосподарського виробництва розроблення та застосування нових профілактичних, лікувальних засобів, які могли б гарантувати зменшення втрат поголів'я тварин і підвищення його стійкості до хвороб різноманітної етіології, є досить актуальною проблемою [5,6,7,8]. Особливу увагу у ветеринарній медицині приділяють боротьбі із опортуністичними кишковими інфекціями [9].

Протягом останніх двох десятиліть у світі різко зріс інтерес до біологічних препаратів, що містять стабілізовані культури симбіотичних живих мікроорганізмів, або продуктів їх ферментації - пробіотиків. Цьому сприяв також бурхливий розвиток біотехнології і ліофілізаційної техніки. Термін «пробіотик» у західній медичній літературі все частіше визначається як «препарат мікробних клітин або їх компонентів з корисним впливом на здоров'я та самопочуття господаря» [9].

Нормальна діяльність багатьох систем організму тварин і людей значною мірою залежить від видового складу та міжвидового співвідношення мікроорганізмів, що заселяють їх з моменту народження [10].

Незважаючи на те, що на сучасному етапі існує багато препаратів з використанням пробіотиків для корекції вторинних імунодефіцитів напрямком робіт є актуальним. Постійна зміна факторів, які впливають на виникнення вторинних імунодефіцитів, створює необхідність в розробці нових препаратів. Роботи виконувались згідно науково-технічної роботи № 013U006049 «Розробка клітинної біотехнології створення новітнього препарату пробіотика для корекції вторинних імунодефіцитів у людей і тварин».

Мета нашої роботи – провести дослідження штамів пробіотиків *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17*. Дослідити придатність мікроорганізмів щодо вирощування на молоці при конструюванні композицій пробіотиків. Встановити придатність штаму *E. coli M-17* для використання при конструюванні композицій пробіотиків. Провести дослідження антагоністичної дії штамів пробіотиків до мікроорганізмів кишкової групи.

Вихідний матеріал, методика та умови дослідження. Об'єктом дослідження були пробіотичні мікроорганізми *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli*

M-17. В роботі використовували культури штамів мікроорганізмів з колекції штамів ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій».

Пробіотичні культури досліджували за морфологічними ознаками, проводили дослідження ростових властивостей на молоці. Визначали активність штамів щодо згортання молока. На підставі отриманих результатів проводили селекційний відбір за цією ознакою. Для культивування мікроорганізмів використовували поживні середовища: Поживне середовище для виділення ентеробактерій сухе (агар Ендо-ГРМ), Поживний агар для культивування мікроорганізмів сухий (ГРМ-агар), агар Колумбія, молоко коров'яче 1,5% стерилізоване, гідролізат молока з додаванням томатного соку та дріжджової води. Мікроскопічні дослідження здійснювали на мікроскопі Leica DM750. Культури пробіотиків фарбували загальноприйнятими методами окраски за Гра-

мом. Культивування пробіотичних мікроорганізмів проводили з використанням сухоповітряного термостату Incucel 55, Чехія.

Дослідження антагоністичної дії проводили на засівах штамів *S. thyphisuis*,

S. choleraesuis, *S. dublin*, *S. cholerae suis* Кіровоград, *P. multocida* Z-84, *S. thyphimurium*, *E. coli* M-17, *E. coli* IBM-1, *E. coli* IBM-2, з колекції ДНУ «ДЦІБ». Штами висівали на агар Колумбія, з одночасним нанесенням дисків з суспензією штамів *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* M-17. Дослідні зразки інкубували в термостаті при температурі 37°C протягом 48 годин. Вимірювання зони пригнічення росту штамів в мм проводили по закінченню інкубування. Досліди проводили в ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій».

Результати досліджень. Штами бактерій *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* M-17 були відібрані з музею

штамів і мікроорганізмів ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій». В ході досліджень встановлено, що клітини *Streptococcus Lactis B-2094* – це стрептококи, диплококи та монококи розміром 0,5×1 мкм, нерухливі. Мікроби утворюють ланцюги різної довжини, частіше диплококи. Добре фарбуються звичайними фарбами, при фарбуванні по Граму – позитивні (рис. 1.).

При глибокому культивуванні на гідролізаті молока *Streptococcus Lactis B-2094* на 24 годину росту утворюють колонії у вигляді чечевичних зерен та дисків для метання, темного коричневого кольору, непрозорі, діаметр 2-3 мм. Через 48 годин колонії можуть збільшуватись до 3-4 мм. При засіві на поживне середовище з 0,005 г фенолового червоного, навколо колоній з'являється жовта кругла зона. На твердих поживних середовищах росте колоніями: поверхневі – дрібні, діаметром до 1 мм, S-форми, безкольорові (рис. 2, 3).

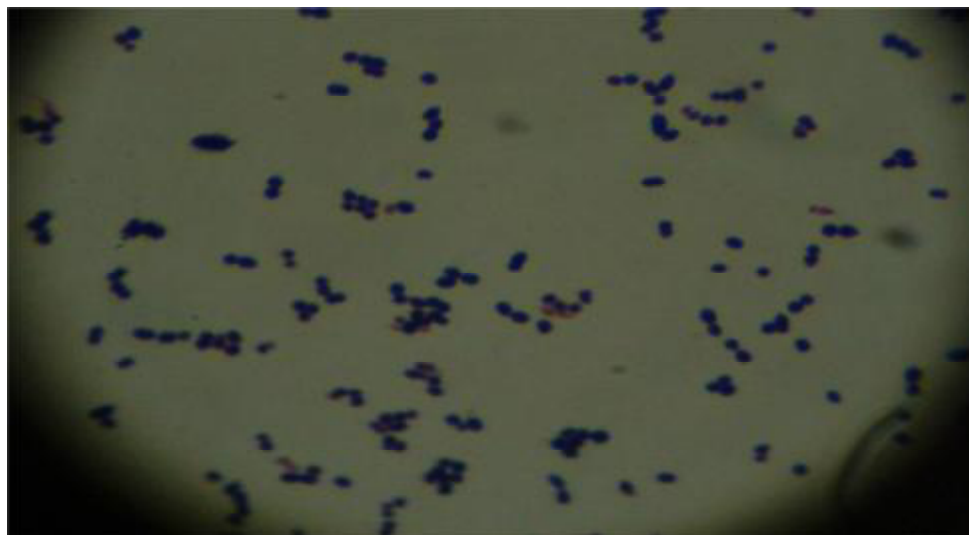


Рис. 1 Добова культура *Streptococcus Lactis B-2094* пофарбована за Грамом. Лесія 100×1,25



Рис. 2 Ріст культура *Streptococcus Lactis B-2094* на Поживному агарі (ГРМ-агар) росинчасті колонії. МБС-2. 12,5×2

На поверхні Поживного агару (ГРМ-агар) *Streptococcus Lactis B-2094* росте дрібними до 1 мм в діаметрі безколірними росинчастими колоніями S-форми. Оптимальна температура росту 27-29⁰ С.

Через 19-24 години культивування на молоці *Streptococcus Lactis B-2094* утворює щільний рівний згусток. При проведенні культивування

Streptococcus Lactis B-2094 виділяє кисломолочні продукти життєдіяльності, які мають приємний запах. Через 18 годин кислотність згустку дорівнює 80-90⁰Т, а через 5-7 днів —100-125⁰ Т.

Періодичність пересіву на живильні середовища – 30 днів, після 30 днів кількість мікробних тіль знижується.

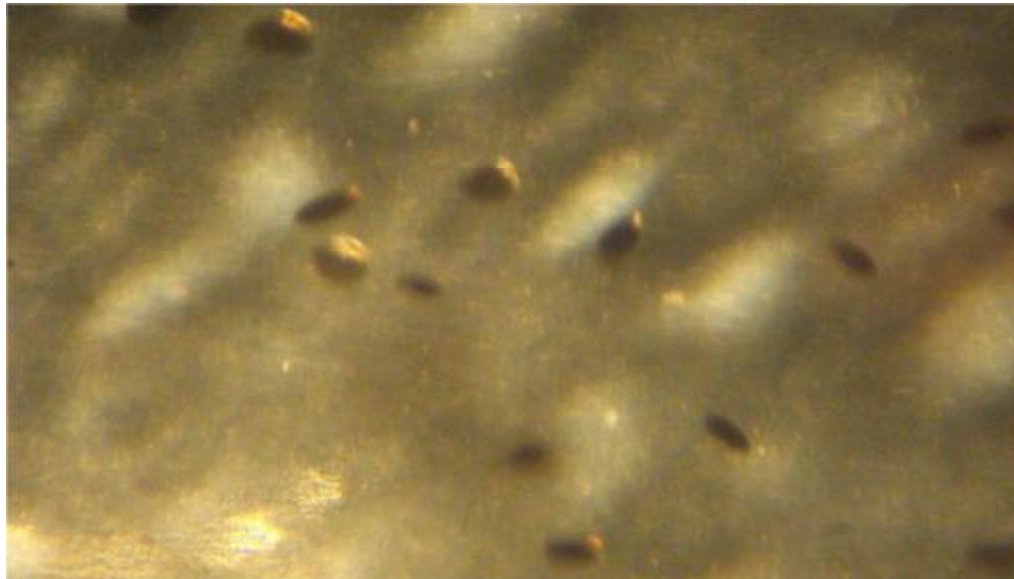


Рис.3 Ріст культури *Streptococcus Lactis B-2094* на Поживному агарі чечевицеподібні колонії. МБС-2. 12,5х2

Важливою властивістю придатності культури *Streptococcus Lactis B-2094* для використання в умовах створення нового препарату пробіотика є активність згортання молока та щільності згустку. Після встановлення морфологічних ознак належних *Streptococcus Lactis B-2094* проводили відбір мікробів штаму за активністю згортання молока. Для проведення випробування готували ряд пробірок з стерильним 1,5 % молоком. В 10 пробірок з молоком (10 см³) вносили культуру молочнокислого стрептококу, відбирали штами, які за 10-12 годин згортали молоко утворюючи щільний згусток. Пробірки в яких за термін спостереження згусток не створився вибраковувались.

В результаті досліджень встановлено що культура штаму *Streptococcus Lactis B-2094* має низький поріг кислотоутворення, завдяки чому можливо отримати культуру пробіотика з низькою кислотністю, що дає можливість використання *Streptococcus Lactis B-2094* у складі пробіотичних композицій.

Штам *Lactobacillus acidophilus* на звичайних незбагачених поживних середовищах не росте. Відмічено активний глибинний ріст на Гідролізаті молока з додаванням томатного соку та дріжджової води. При рості в розплаві середовища дає характерні колонії у вигляді комочків вати. При мікроскопічному дослідженні виявляються довгі, як соломини палички, різної довжини. Бактерія виживає в кислому середовищі – рН 4-5 та опти-

мально росте за температурами біля 30-40⁰С. *Lactobacillus acidophilus* ферментує лактозу до молочної кислоти. Добова кислотність культури *Lactobacillus acidophilus* становить 180-200⁰ Т.

Для відбору активних штамів культури *Lactobacillus acidophilus* проводили селекційний відбір за ознакою здатності до згортання молока. Активність зброджування молока є важлива властивість придатності культури для використання в умовах біологічного виробництва.

Для випробування культуру засівали аналогічно так як культуру *Streptococcus Lactis B-2094* в 10 пробірок з молоком (10 см³). Відбирали штами які за 8-10 годин згортали молоко утворюючи рівний щільний згусток. Пробірки, в яких за термін спостереження згусток не створився не використовувалися. Добова кислотність становила 180-200⁰Т.

Важливим етапом дослідних робіт було дослідження штаму *E. coli M-17*. Представлений мікроб є непатогенна кишкова паличка, який постійно перебуває у кишечнику людини і тварини. *E. coli M-17* – представник нормофлори кишечника.

Мікроби *E. coli M-17* мають розміри 0,5-0,8х1,5-3 мкм. Поліморфна, іноді кокоподібна, при фарбуванні за Грамом – негативна. На Поживному агарі (ГРМ-агар) росте у вигляді блідих колоній S-форми. На середовищі Ендо *E. coli M-17* ростуть колоніями з золотисто-металевим

Вісник Сумського національного аграрного університету

Серія «Ветеринарна медицина», випуск 1 (34), 2014

блиском, малиново-червоного кольору, що є ознакою її не патогенності (Рис. 4). Факультативний анаероб. Штам *E. coli* M-17 культивується за температури 35-37° С. Непатогенний для тварин.

Для вивчення ростових властивостей на молоці штам культури *E. coli* M-17 засівали аналогічно як *Streptococcus Lactis* B-2094 та *Lactobacillus acidophilus* у 10 пробірок з молоком і культивува-

ли 24 години при температурі 37°С. Після закінчення терміну інкубування проводили візуальне оцінювання наявності росту – згустку. Згусток мікроби створюють не щільний, з розшаруванням та утворенням шарів сироватки. На основі цієї здатності були відселекційовані штами, які здатні рости на молоці. Добова кислотність становила 70-75°Т.

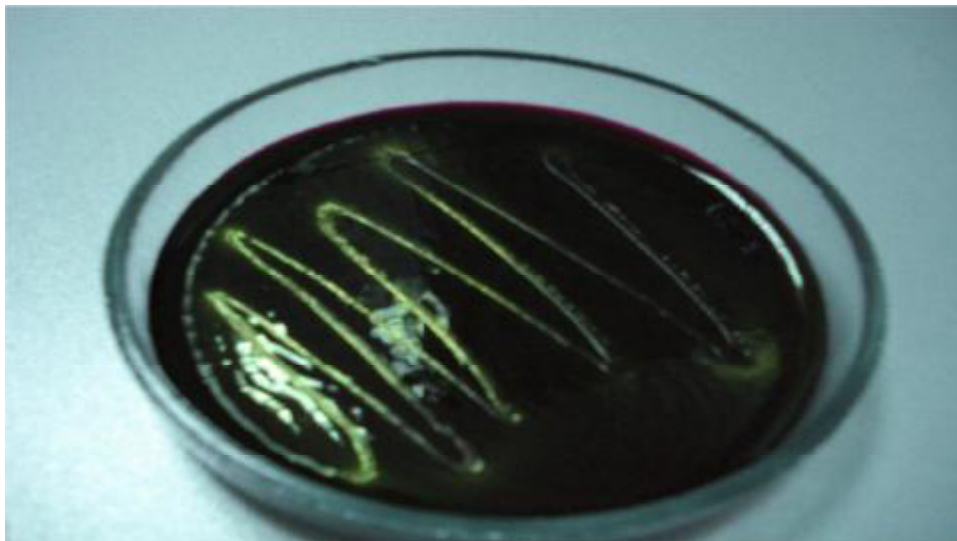


Рис. 4 Ріст культури *E. coli* M 17 на агарі Ендо, МБС-2, 12,5×2

Дослідження антагоністичної дії штамів *Streptococcus Lactis* B-2094, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* M-17 проводили на засівах штамів *S. typhisuis*, *S. cholerae suis*, *S. dublin*, *S. cholerae suis* Кіровоград, *P. multocida* Z-84, *S. typhimurium*, *E. coli* M-17, *E. coli* IBM-1, *E. coli* IBM-2 з колекції ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій». Штами висівали на агар

Колумбія, зодчасним нанесенням дисків з суспензією штамів *Streptococcus Lactis* B-2094, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* M-17. Дослідні зразки інкубували в термостаті при температурі 37°С на протязі 48 годин. Через 48 годин вимірювали зони пригнічення росту штамів в мм. Антагоністичної дії не виявлено рисунок 5.

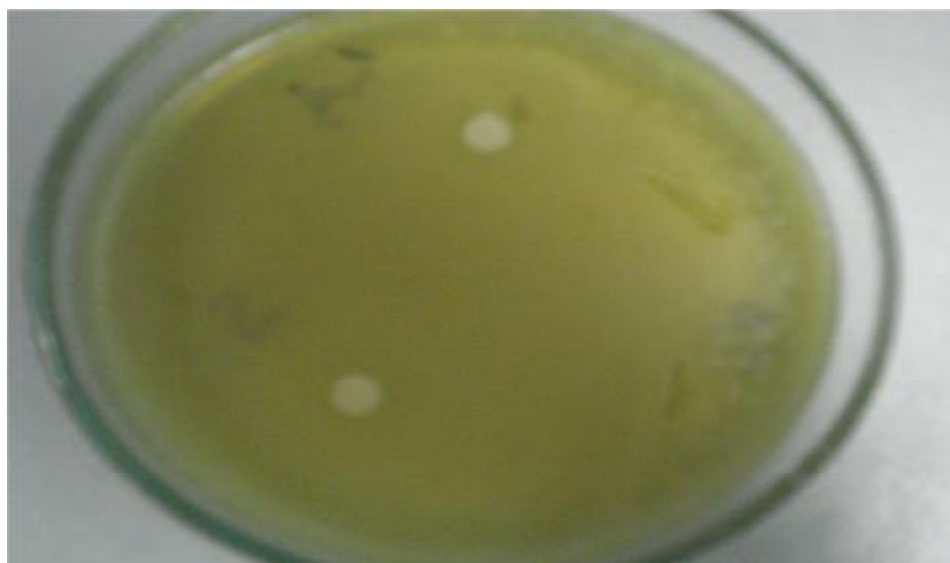


Рис. 5 Відсутність антагоністичної дії штаму *Streptococcus Lactis* B-2094 до мікробів *E. coli* IBM-1.

Відселекційовані штами мікроорганізмів були виділені і сформовані у робочий музей. Досліди повторювали в трьох аналогічних послідовностях

за однаковою схемою, через 30 діб після останнього пересіву. Штами *Streptococcus Lactis* B-2094 *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli* M-17 вияви-

Вісник Сумського національного аграрного університету

лись придатними для створення композиції пробіотиків в системі розробки нового препарату пробіотика. Отриманні результати вказують на перспективність проведення подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Проведено дослідження та надана характеристика штамів пробіотиків *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17*. Визначена придатність досліджених штамів для вирощування на молоці при конструюванні композицій пробіотиків.

2. Встановлена придатність штаму *E. coli M-17* для використання при створенні препаратів пробіотиків.

3. Експериментально доведено, штами *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17* не проявляють антагоністичної дії до мікробів музейних штамів тест-культур та вірулентних штамів *S. thyphisuis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. choleraesuis Kіровоград*, *P. multocida Z-84*, *S. thyphimurium*, *E. coli M-17*, *E. coli IBM-1*, *E. coli IBM-2*.

Список використаної літератури:

1. Радчук Н. А. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебное пособие / Н. А. Радчук. – Москва: Агропроиздат, 1991. – 383 с.
2. Шендеров Б. А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека / Б. А. Шендеров // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 1998. — Т. 7.— № 1. — С. 61–65.
3. Хавкин А. И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А. И. Хавкин // РМЖ. — 2003. — Т. 11.— № 3.— С. 122-126.
4. Клінічна імунологія та алергологія: Підручник / Г. М. Дранік [та ін.] // К.: Здоров'я, 2006.— 888 с.
5. Акименко Л. Пробиотики у ветеринарній медицині / Л. Акименко // Ветеринарна медицина України. — 2005. — № 5. — С. 37–38.
6. Кощаев А. Г. Эффективность кормовых добавок Бацелл и Моноспорин при выращивании цыплят-бройлеров / А. Г. Кощаев // Ветеринария. — 2007. — № 1. — С. 16–17.
7. Новик Г. И. Прикладная биохимия и микробиология / Г. И. Новик [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — М.: Наука. — 2006. — Т.42.— № 2.— С. 187–194.
8. Панин А. Н. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных / А. Н. Панин, Н. И. Малик // Ветеринария.— 2006.— № 7. — С. 3–6.
9. Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. Probiotics: how should they be defined? // Trend Food Sci. Technol.— 1999.—Vol. 10.— P. 107–110.
10. Брындына И. Г. Стресс-устойчивость и неспецифическая резистентность организма / И. Г. Брындына [и др.] // Аллергология. Иммунология — 2004.— № 1. — С. 33–37.

Завирюха А. А., Васильева Т.Б., РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ШТАМОВ ПРОБИОТИКОВ В СИСТЕМЕ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТОВ У ЖИВОТНЫХ

В статье представлены результаты исследования культур пробиотиков *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M 17*. Представлены основные характеристики и определена пригодность исследуемых штаммов для культивирования на молоке при конструировании пробиотических композиций. Экспериментально показано отсутствие антагонистического действия штамов *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M 17* по отношению к микробам музейных штамов тест-культур и вирулентных штамов *S. thyphisuis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. cholerae suis Kіровоград*, *P. multocida Z-84*, *S. thyphimurium*, *E. coli M 17*, *E. coli IBM 1*, *E. coli IBM-2*.

Ключевые слова: пробиотики, штаммы, разработка, биотехнология, препараты.

Zaviriukha A. A., Vasileva T. B., RESULTS STRAINS PROBIOTICS IN THE ESTABLISHMENT OF A NEW DRUG FOR CORRECTION SECONDARY IMMUNODEFICIENCY ANIMALS

The article presents the results of a study of cultures of probiotics *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17*. The main characteristics to determine the suitability of the test strains for cultivation on the design of probiotic milk compositions. Experimentally demonstrated absence of antagonistic action strains of *Streptococcus Lactis B-2094*, *Lactobacillus acidophilus*, *E. coli M-17* with respect to the strains of microbes Museums test cultures and virulent strains of *S. thyphisuis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. cholerae suis Kіrovograd*, *P. multocida Z-84*, *S. thyphimurium*, *E. coli M-17*, *E. coli IBM-1*, *E. coli IBM-2*.

Keywords: probiotics strains, development, biotechnology, drugs.

Рецензент: к.вет.н., професор Зон Г. А.

Дата надходження до редакції: 20.12.2013 р.