



УДК 576.852.24

ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ ЗІ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ КРОЛИКІВ

Ю. М. Похилько, Н. О. Кравченко

*Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН України
вул. Шевченка, 97, Чернігів 14027, Україна
e-mail: pohilko.yura@gmail.com*

Досліджено пробіотичні властивості (антагоністичні й адгезивні) молочнокислих бактерій, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів. Встановлено, що високу антагоністичну активність до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів проявили досліджувані штами: *Lactobacillus lactis* 4/1, *Lactobacillus casei* 5/4, *Lactobacillus helveticus* 13/2, *Lactobacillus plantarum* 17/2, *Lactobacillus plantarum* 17/3, *Lactobacillus acidophilus* 49/1. Досліджено рівень адгезії молочнокислих бактерій до еритроцитів крові кролика, миші, свині, великої рогатої худоби, людини. Виявлено найвищий рівень адгезії (83 %) до еритроцитів крові кролика, найнижчий (53 %) – до еритроцитів крові ВРХ. Показано можливість використання штаму *L. helveticus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій. Введення дослідним тваринам молочнокислих бактерій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу дало змогу зберегти 90–100 % дослідних тварин. За використання молочнокислих бактерій після введення тваринам збудників сальмонельозу збереженість поголів'я становила 67–73 %.

Ключові слова: пробіотики, молочнокислі бактерії, антагоністична активність, адгезія, сальмонельоз

ВСТУП

За умов промислового ведення сучасного тваринництва, внаслідок обмеженого використання антибіотиків під час вирощування тварин згідно з Законом України “Про ветеринарну медицину” [10], актуальним завданням є розроблення нових альтернативних засобів боротьби з опортуністичними кишковими інфекціями.

У зв'язку з цим упродовж останніх років у світі та в Україні зріс інтерес до бактеріальних препаратів на основі живих мікробних культур – пробіотиків. Найчастіше до складу таких препаратів входять молочнокислі бактерії (МКБ). Характерна властивість молочнокислих бактерій – здатність продукувати речовини (органічні кислоти, етанол, гідроген пероксид, лізоцим, низин, ацидофілін, лактоцил, лактобrevін, лактобацилін та ін.), які мають виражену антибіотичну активність. МКБ проявляють антагонізм до різних груп мікроорганізмів, зокрема, до патогенних і умовно-патогенних [6].

Пробіотики, які застосовуються для профілактики та лікування захворювань шлунково-кишкового тракту кроликів, мають у своєму складі бактерії, виділені з різних еконіш. Такі препарати є універсальними, тому їх рекомендують для різних видів тварин, у тому числі й кроликів. У зв'язку з цим актуальним залишається створення пробіотичного препарату на основі біологічно активних представників облігатної мікробіоти шлунково-кишкового тракту саме цих тварин.

Перспективною групою мікроорганізмів у створенні пробіотичного препарату для кроликів є бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус “Generally recognized as safe” та “Qualified presumption of safety”, тобто їхнє використання є абсолютно безпечним. Чисельність МКБ у шлунково-кишковому тракті кроликів перевищує чисельність біфідобактерій, незалежно від раціону й типу годівлі [13], значущою є і їхня функціональна роль у макроорганізмі.

Важливими критеріями відбору мікроорганізмів, що входять до складу пробіотичних препаратів, є їхня здатність пригнічувати ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а також колонізувати шлунково-кишковий тракт макроорганізму.

Метою нашої роботи було дослідити основні пробіотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту (сліпої кишки) кроликів, і можливість їхнього використання для профілактики та лікування сальмонельозних інфекцій.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили в лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН).

Досліджували антагоністичну активність і показник адгезії бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі сліпої кишки кроликів. Бактерії ідентифіковані в лабораторії пробіотиків ІСМАВ НААН за культурально-морфологічними та біохімічними властивостями: *L. lactis* 4/1, *L. casei* 5/4, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 16/3, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. delbrueckii* 39/2, *L. acidophilus* 49/1 [14], а також типового штаму *L. acidophilus* ССМ 4833, отриманого з депозитарію Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Тест-культурами були 8 штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів: *Proteus mirabilis* № 3177, *Proteus vulgaris* № 13, *Staphylococcus aureus* № 906, *Salmonella typhimurium* № 89, *Shigella flexneri* 2a № 160, *Klebsiella pneumoniae* № 67, *Escherichia coli* 055K59 № 3912, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Штами умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів отримано з Чернігівської обласної санітарно-епідеміологічної станції. Використаний у роботі штам *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* одержано з колекції штамів мікроорганізмів лабораторії пробіотиків ІСМАВ НААН.

Патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми культивували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) за температури 37 °С упродовж 24 год, а молочнокислі бактерії – на поживному середовищі MRS [4] за температури 37 °С упродовж 48 год. Дослідження антагоністичної активності проводили *in vitro* дифузним методом агарових блоків [8].

Для дослідження адгезивних властивостей бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів, нами обрано метод, який базується на різниці оптичної щільності (ОЩ) [16]. Експерименти проводили зі суспензіями бактерій, що відповідали 1,0 од. ОЩ за довжини хвилі світла 540 нм. Субстратом

адгезії були еритроцити людини II (A)Rh-групи крові, а також лабораторних (миші, кролика) та сільськогосподарських тварин (свині, великої рогатої худоби). Кров людини отримували з Чернігівської станції переливання крові. Як антикоагулянти крові використовували 3,8% розчин лимоннокислого натрію (1:10). Еритроцити тричі відмивали десятикратним об'ємом 0,9% розчину хлориду натрію з подальшим центрифугуванням за 1000 об./хв упродовж 5 хв і ресуспензували в тому ж розчині. Кінцева концентрація еритроцитів у суспензії становила $1,0 \times 10^{12}$ кл/л.

Під час проведення експерименту змішували у пробірках 1,0 мл суспензії еритроцитів і 2,5 мл суспензії бактерій. Контролем були проби, що містили: 2,5 мл суспензії бактерій та 1,0 мл 0,9% розчину натрій хлориду; 1,0 мл суспензії еритроцитів і 2,5 мл 0,9% розчину хлориду натрію. Зразки інкубували на платформі, що обертається, за 37 °C упродовж 30 хв, після чого еритроцити осаджували центрифугуванням 1000 об./хв упродовж 1,5 хв. Потім зі зразків відбирали надосадову рідину об'ємом 2,0 мл та на фотоелектроколориметрі КФК-2 визначали величину її ОЩ.

Фіксуючи активність еритроцитів до бактеріальної суспензії досліджуваних штамів розраховували за формулою:

$$PA = \frac{D_{k1} + D_{k2} - D_{d3}}{D_{k1}} \times 100\%,$$

де ПА – показник адгезії; Дк1 – ОЩ надосадової рідини в першому контрольному зразку; Дк2 – ОЩ надосадової рідини в другому контрольному зразку; Ддз – ОЩ надосадової рідини в дослідному зразку.

Дослідження можливості використання бактерій роду *Lactobacillus* для профілактики сальмонельозних інфекцій проводили у дослідях *in vivo* на білих лабораторних мишах вагою 10–14 г. Для дослідження впливу введення молочнокислих бактерій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу тварин розділяли на три контрольні та дві дослідні групи по 10 голів у кожній. Перша група залишалася інтактною, тваринам цієї групи згодовували впродовж усього експерименту лише звичайний раціон. Тварини другої і третьої контрольних груп отримували звичайний раціон, а на восьму добу досліду їм вводили *per os* суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 та *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* відповідно. Кожна доза містила $2,5 \times 10^6$ КУО бактерій. Тваринам четвертої та п'ятої дослідних груп упродовж тижня, окрім звичайного раціону, *per os* вводили ферментоване *L. helveticus* 13/2 знежирене молоко в дозі, що містила 1×10^8 КУО бактерій. На восьму добу експерименту тваринам дослідних груп вводили до раціону суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 (четвертій групі тварин) та *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* (п'ятій групі тварин) у тих самих дозах, що й тваринам другої і третьої контрольних груп. За станом здоров'я мишей стежили упродовж 15-ти діб після введення бактерій роду *Salmonella*.

Також нами вивчався ефект введення бактерій *L. helveticus* 13/2 після введення збудників сальмонельозних інфекцій лабораторним тваринам. Тварин розділяли на три контрольні та дві дослідні групи по 10 голів у кожній. Перша група залишалася інтактною, тваринам цієї групи згодовували упродовж усього експерименту лише звичайний раціон. Тваринам другої і третьої контрольних груп вводили *per os* суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 та *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* відповідно. Кожна доза містила 1×10^9 КУО бактерій. Тваринам дослідних груп було введено суспензії, що містили *Salmonella typhimurium* № 89 (четвертій групі тварин) і *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* (п'ятій групі

тварин) у тих самих дозах, що й тваринам другої та третьої контрольних груп. Тваринам четвертої та п'ятої дослідних груп через 20 хв після введення суспензій, що містили бактерії роду *Salmonella* упродовж 15 діб, окрім звичайного раціону, *per os* задавали ферментоване штамом *L. helveticus* 13/2 знежирене молоко, у дозі, що містила 1×10^8 КУО. За станом здоров'я мишей стежили впродовж 15-ти діб. Під час проведення досліджень із тваринами поводитись відповідно до загальних етичних вимог щодо використання хребетних тварин у медичних і біологічних експериментах [15], на підставі рішення засідання комісії з питань етики та біоетики Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (протокол №1 від 21 липня 2015 року).

Результати досліджень представлено як середнє значення з поправкою на стандартну похибку. Статистичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу, використовуючи програму "Microsoft Excel 2010". Різницю між значеннями показників, що порівнювалися, вважали вірогідною при $p \leq 0,05$ [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій привернули увагу дослідників і науковців уже давно та на сьогодні описані в літературі досить широко [3, 6]. Відомо, що антимікробний вплив цих мікроорганізмів обумовлюється дією органічних кислот і низкою інших речовин, які продукують молочнокислі бактерії, що характеризуються антагоністичною активністю навіть за їхніх низьких концентрацій у середовищі. До цієї категорії належать антибіотичні речовини: лактоцил, лактобrevін, низин, лактобацилін тощо [6]. Антагоністична активність молочнокислих бактерій також може бути обумовлена утворенням гідроген пероксиду, лізоциму, бактеріоцинів. Здатність молочнокислих бактерій пригнічувати ріст широкого спектра мікроорганізмів (особливо грамнегативних) відіграє важливу роль у формуванні мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту людини і тварин.

Нами встановлено, що бактерії роду *Lactobacillus*, виділені з травної системи кроликів, виявляють різний ступінь пригнічувальної дії на досліджувані тест-культури (рис. 1).

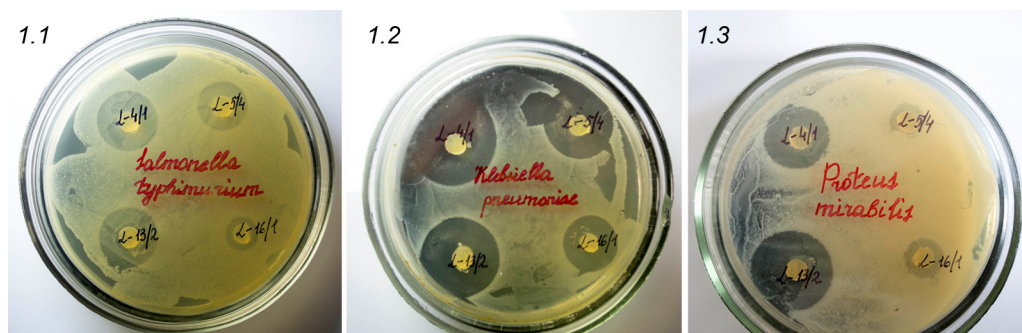


Рис. 1. Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів, до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів: 1.1 – до *Salmonella typhimurium*; 1.2 – до *Klebsiella pneumoniae*; 1.3 – до *Proteus mirabilis*

Fig. 1. Antagonistic activity of bacteria of *Lactobacillus* genus, isolated from the gastrointestinal tract of rabbits, to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms: 1.1 – to *Salmonella typhimurium*; 1.2 – to *Klebsiella pneumoniae*; 1.3 – to *Proteus mirabilis*

Встановлено, що молочнокислі бактерії найбільше пригнічують ріст досліджуваних мікроорганізмів *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium* та *K. pneumoniae* (див. таблицю).

Високу антагоністичну дію на патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми нами виявлено у досліджуваних штамів молочнокислих бактерій: *L. lactis* 4/1, *L. casei* 5/4, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 49/1.

Антагоністична дія досліджуваних штамів молочнокислих бактерій залежала від виду тест-мікроорганізмів. Встановлено, що під впливом 50 % досліджуваних штамів бактерій (зокрема, *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 49/1) зони інгібування росту *Salmonella typhimurium* № 89 були більше 20 мм. Проте зони затримки росту *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* були більшими 20 мм лише під впливом 20 % досліджуваних штамів: *L. helveticus* 13/2 і *L. plantarum* 17/2.

Найвищу антагоністичну активність встановлено у штаму *L. helveticus* 13/2, що спричиняв утворення зон інгібування росту більше 20 мм до всіх використаних у роботі тест-культур, окрім *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 і *Staphylococcus aureus* № 906.

Отримані дані підтверджують, що ізольовані нами з травної системи кроликів бактерії роду *Lactobacillus* мають високий бактеріостатичний потенціал щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, тому застосування найперспективніших штамів у тваринництві може вплинути на рівень шлунково-кишкових захворювань тварин.

Мікроорганізми, що населяють кишечник, за місцем локалізації поділяються на дві групи: пристінкові, тобто прикріплені до стінки кишечника, і порожнинні, які вільно розташовуються у порожнині. Багато представників МКБ належать до облігатної пристінкової мікробіоти [5]. Відновлення нормальної чисельності МКБ є однією з важливих складових лікування та профілактики шлунково-кишкових захворювань людини і тварин. Важливою умовою ефективності такого лікування є прикріплення МКБ до клітин епітелію шлунково-кишкового тракту макроорганізму. Це дає їм змогу впливати на процеси відновлення муцинів передепітеліального слизового бар'єру та функціонування епітеліальних клітин, їхніх структурних компонентів і міжклітинних взаємозв'язків, що покращує захисні властивості слизової оболонки кишечника. Такий вплив забезпечує також зменшення адгезії, інвазії та транслокації патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів до внутрішнього середовища організму [3]. Адгезія молочнокислих бактерій – складний процес, у якому задіяні як специфічні (ліганд-рецепторні), так і неспецифічні (гідрофобні, електростатичні) взаємодії між мікробними клітинами і епітеліоцитами. Як адгезини слугують ліпотейхоєві та тейхоєві кислоти, що є компонентами їхньої клітинної стінки, або лектини, а також колаген, фібронектин, ламінін, олігосахаридні ланцюги, манозоспецифічні рецептори [9].

Молекулярні механізми, що забезпечують адгезію молочнокислих бактерій до клітин епітелію, на сьогоднішній день повністю не вивчені. Рецептори молочнокислих бактерій, відповідальні за цей процес, мають білкову або карбогідратну природу, опубліковано дані про участь у цьому процесі ліпотейхоєвих кислот [1, 11].

Очевидно, адгезія молочнокислих бактерій є специфічною і залежить від рецепторів конкретного штаму та рецепторів клітин епітелію певного макроорганізму.

Беручи до уваги вищезазначене, для корекції кишкової мікробіоти тварин доцільно використовувати бактерії, виділені від тварин того ж виду. Тому наступним

Антагоністична активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів, до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів ($M \pm m$, $n = 8$)
Antagonistic activity of bacteria of *Lactobacillus* genus isolated from the gastrointestinal tract of rabbits, to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms ($M \pm m$, $n = 8$)

| Досліджувані бактерії | Середнє значення зон інгібування росту умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів, мм | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Shigella flexneri</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Salmonella enteritidis</i> | |
| <i>L. lactis</i> 4/1 | 22,0±0,2* | 22,7±0,5* | 18,0±1,2* | 21,0±0,1* | 16,5±2,2 | 32,0±1,8* | 19,5±0,7 | 17,7±0,1* | 14,0±0,2 | |
| <i>L. casei</i> 5/4 | 18,0±2,0 | 16,5±1,0 | 16,7±0,2 | 16,0±0,1* | 14,0±0,2 | 23,0±1,8 | 18,3±0,2 | 15,0±0,7* | 14,0±0,5* | |
| <i>L. helveticus</i> 13/2 | 27,0±0,1* | 23,0±1,5* | 19,3±1,2* | 20,0±0,1* | 20,0±0,1* | 28,0±2,2* | 20,5±0,1* | 18,0±1,8* | 20,0±0,5* | |
| <i>L. plantarum</i> 16/1 | 18,5±0,1 | 19,5±1,0* | 12,7±0,2* | 13,0±2,7* | 17,0±0,7 | 18,0±2,0* | 14,0±1,5* | 14,0±0,7* | 13,0±0,7 | |
| <i>L. plantarum</i> 16/3 | 14,3±0,7* | 18,0±0,5 | 19,0±0,7* | 18,3±0,2 | 15,0±1,8* | 14,0±0,1* | 16,7±0,8 | 16,7±0,8* | 17,0±1,2* | |
| <i>L. plantarum</i> 17/2 | 20,0±1,0* | 20,0±1,5* | 14,3±0,1* | 21,0±0,1* | 12,7±0,6* | 21,0±1,2 | 18,7±0,2 | 21,0±1,5* | 20,0±2,8* | |
| <i>L. plantarum</i> 17/3 | 17,2±0,7 | 16,5±0,5 | 16,3±1,7 | 20,0±1,0* | 16,0±0,1* | 15,0±0,2* | 17,0±0,7 | 19,0±0,7* | 16,0±0,1* | |
| <i>L. acidophilus</i> 31/2 | 19,2±0,5* | 18,3±0,5 | 17,0±0,1 | 17,0±0,7 | 11,0±0,3* | 17,0±0,8* | 15,0±0,7* | 15,0±0,2* | 14,0±0,2* | |
| <i>L. delbrueckii</i> 39/2 | 17,8±0,5 | 18,0±1,0 | 12,7±0,7 | 12,0±0,2 | 15,0±0,5* | 16,0±0,2* | 12,7±0,1* | 12,0±0,2 | 14,0±0,7 | |
| <i>L. acidophilus</i> 49/1 | 22,3±1,5* | 20,3±0,5* | 20,0±2,0* | 22,0±1,8* | 24,0±1,5* | 18,0±1,7* | 19,7±0,7* | 17,0±1,7* | 17,0±0,2* | |
| <i>L. acidophilus</i> CCM 4833 | 18,0±0,4 | 17,0±1,2 | 16,3±0,7 | 17,0±0,2 | 18,0±0,3 | 20,0±1,8 | 18,0±0,5 | 12,0±0,7 | 13,0±0,2 | |

Примітка: * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни порівняно зі штамом *L. acidophilus* CCM 4833

Comment: * – $P < 0,05$ – significant changes compared to the strain *L. acidophilus* CCM 4833

етапом наших досліджень було завдання встановити адгезивну активність досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* (рис. 2).

Встановлено, що бактерії роду *Lactobacillus*, виділені від кроликів, проявляли найвищий рівень адгезії до еритроцитів кролика, що в середньому становив 83 %. Рівень адгезії до еритроцитів миші, свині, людини становив, відповідно, 75, 66, 58 %. Найнижчий рівень адгезії (51 %) виявлено до еритроцитів крові ВРХ.

Отже, найвищий показник адгезії досліджувані бактерії проявляли до еритроцитів крові кроликів. Одержані результати підтверджують гіпотезу, що для кожного виду тварин необхідно використовувати пробіотичний препарат, розроблений на основі представників облигатної мікробіоти шлунково-кишкового тракту цього конкретного виду тварин. Такий підхід забезпечить максимальний ефект під час використання препарату.

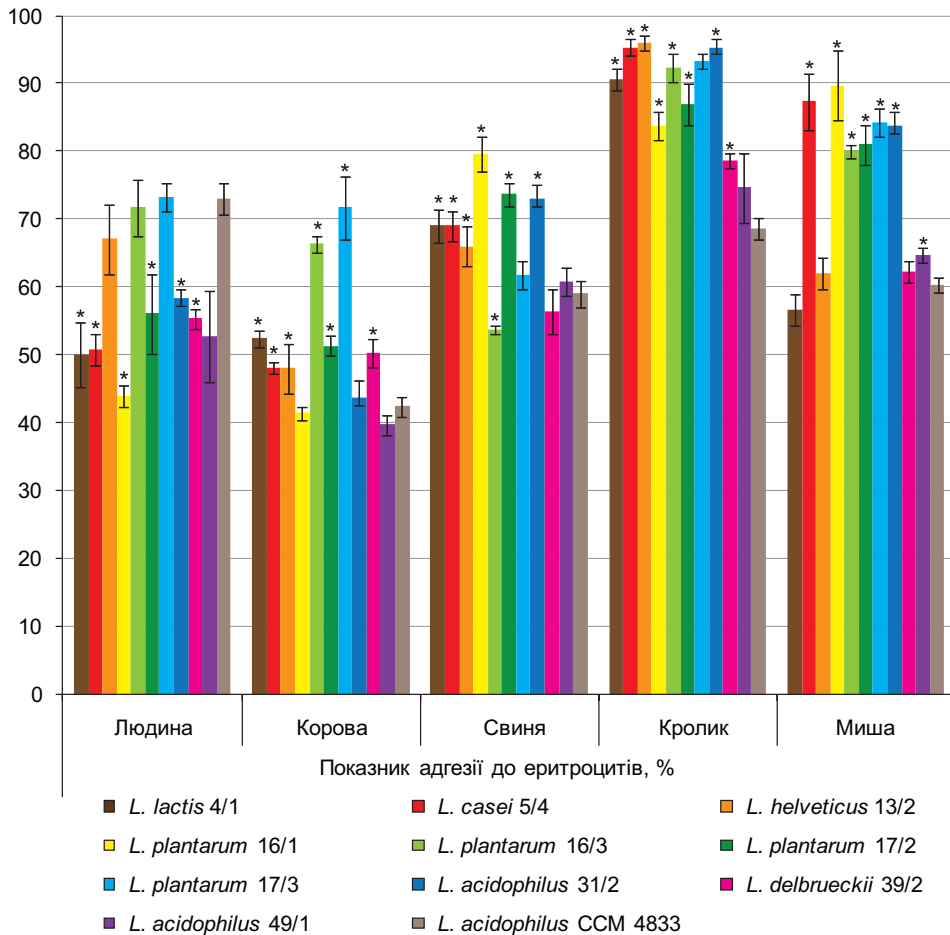


Рис. 2. Адгезивна активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів, до еритроцитів крові людини і тварин ($M \pm m$, $n = 3$). * – $P < 0,05$ – вірогідні зміни порівняно зі штамом *L. acidophilus* CCM 4833

Fig. 2. Adhesive activity of bacteria of *Lactobacillus* genus isolated from the rabbit's intestinal tract, to erythrocytes of human and animal blood ($M \pm m$, $n = 3$). * – $P < 0.05$ – significant changes compared to the strain *L. Acidophilus* CCM 4833

Одержані результати свідчать, що відповідно до основних критеріїв відбору, які наведені у FAO/WHO guidelines for evaluation of probiotics in food [7], штам *L. helveticus* 13/2 може бути рекомендований для створення пробіотичних препаратів для кроликів.

На даний час для лікування та профілактики сальмонельозу застосовують комплексні антибактеріальні препарати. Однак антибіотики і хіміотерапевтичні засоби не завжди ефективні, оскільки сальмонели мають стійкість до багатьох антибіотиків [17]. У зв'язку з цим ВООЗ не рекомендує використовувати антибіотики в боротьбі з цією інфекцією [2].

Поширення сальмонельозоносійства серед людей і тварин, відсутність тенденції до зниження захворюваності у більшості країн світу, збільшення контамінації сальмонелами різних об'єктів зовнішнього середовища спонукають до пошуку нових ефективних засобів боротьби із захворюванням [18]. Для нормалізації зміненого складу мікробіоценозу макроорганізму внаслідок сальмонельозу застосовують пробіотики.

У наших подальших досліджах *in vivo* на лабораторних мишах було вивчено можливість використання штаму *L. helveticus* 13/2 з метою профілактики сальмонельозних інфекцій.

Нами виявлено позитивний ефект введення молочнокислих бактерій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу тварин. Упродовж перших 5 діб спостереження збереженість тварин становила 100 % у всіх групах, окрім другої контрольної, де збереженість знизилася до 77 %. У період з 6-ї по 10-ту добу смертність тварин у другій контрольній групі становила 77 %, а у третій контрольній групі – 53 %. У цей же період спостереження збереженість тварин у четвертій і п'ятій дослідних групах 100 %. Загалом, за весь термін спостереження у другій і третій контрольних групах смертність тварин сягала 100 %, а у дослідних групах лише у п'ятій вона становила 10 %. У першій контрольній групі за час експерименту падежу не було.

Встановлено, що використання штаму *L. helveticus* 13/2 дало змогу забезпечити збереженість 100 % дослідних тварин у групі у разі зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і 90 % – у разі *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* (рис. 3).

У досліджах *in vivo* на лабораторних мишах встановлено позитивний ефект застосування штаму *L. helveticus* 13/2 після введення збудників сальмонельозу дослідним тваринам (рис. 4).

Так, за перші п'ять діб спостереження збереженість тварин зростала тільки у четвертій контрольній групі, порівняно з другою контрольною групою. Нами відмічено, що вже на п'яту добу введення знежиреного молока, ферментованого *L. helveticus* 13/2, у деяких мишей дослідних груп спостерігали відсутність клінічних ознак захворювання. Порівняно з контролем, суттєво зменшилася смертність тварин у період з 6-ї по 10-ту добу лікування. У четвертій дослідній групі за цей період спостерігали зменшення смертності тварин, порівняно з другою контрольною групою. Введення лабораторним тваринам молока, ферментованого досліджуваним штамом молочнокислих бактерій, виявилось ефективним у п'ятій дослідній групі, де смертність зменшилась у 4 рази, порівняно з третьою контрольною групою. У разі введення лабораторним тваринам лише суспензій бактерій роду *Salmonella* в дозі, що містила 1×10^9 КУО, смертність тварин до 15-ї доби становила 100 %. У першій контрольній групі за час експерименту падежу не було.

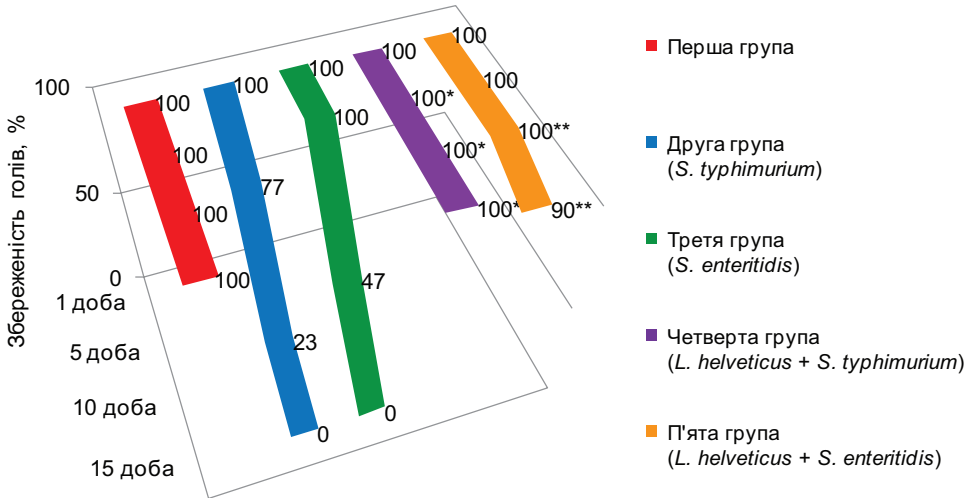


Рис. 3. Ефективність використання штаму *L. helveticus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій перед інфікуванням збудниками сальмонельозу, збереженість голів (n = 10)

Примітки: * – P < 0,05 – вірогідні зміни збереженості голів порівняно з другою групою; ** – P < 0,05 – вірогідні зміни збереженості голів порівняно з третьою групою

Fig. 3. Efficacy of the use of *L. helveticus* strain 13/2 for the prophylaxis of salmonella infections before infection with salmonella, head safety (n = 10)

Comments: * – P < 0.05 – significant changes in the preservation of the head compared to second group; ** – P < 0.05 – significant changes in the preservation of the head compared to third group

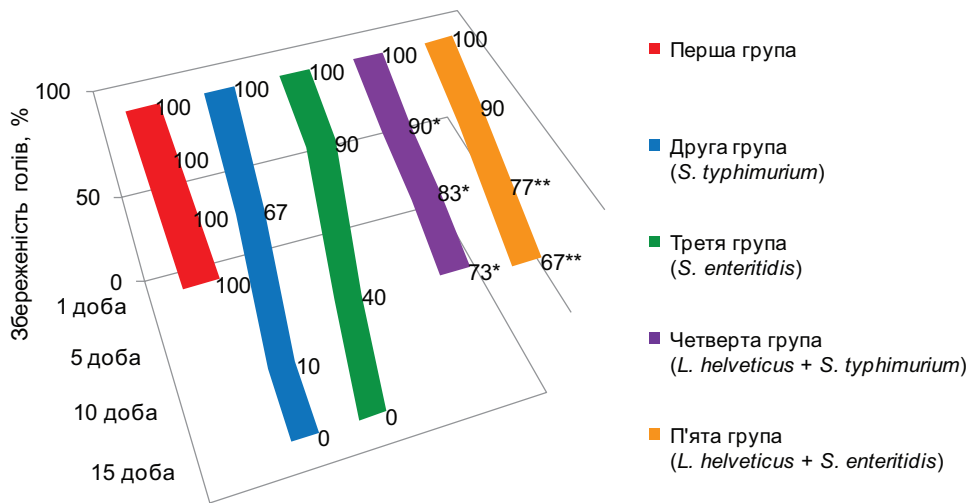


Рис. 4. Ефективність використання штаму *L. helveticus* 13/2 для профілактики сальмонельозних інфекцій після інфікування збудниками сальмонельозу, збереженість голів (n = 10)

Примітки: * – P < 0,05 – вірогідні зміни збереженості голів порівняно з другою групою; ** – P < 0,05 – вірогідні зміни збереженості голів порівняно з третьою групою

Fig. 4. Efficacy of using *L. helveticus* strain 13/2 for the prophylaxis of salmonella infections after infection with salmonella, head safety (n = 10)

Comments: * – P < 0.05 – significant changes in the preservation of the head compared to second group; ** – P < 0.05 – significant changes in the preservation of the head compared to third group

Отже, введення штаму *L. helveticus* 13/2 після інфікування збудниками сальмонельозу лабораторних мишей дало змогу зберегти 73 та 67 % дослідних тварин під час зараження *Salmonella typhimurium* № 89 і *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko*, відповідно.

Отриманий позитивний ефект застосування бактерій *L. helveticus* 13/2 для профілактики сальмонельозу в лабораторних тварин, на нашу думку, пояснюється наявністю у досліджуваного штаму молочнокислих бактерій антагоністичної дії до збудників сальмонельозних інфекцій. Крім того, висока адгезивна активність молочнокислих бактерій, імовірно, сприяла колонізації штаму *L. helveticus* 13/2 слизової оболонки шлунково-кишкового тракту дослідних тварин. У зв'язку з цим, загалом, підвищилася захисна здатність облігатної мікробіоти шлунко-кишкового тракту, що перешкодило колонізації збудників сальмонельозних інфекцій на слизовій оболонці кишечника дослідних тварин.

ВИСНОВКИ

Досліджено деякі пробіотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів. Виявлено, що найбільшу антагоністичну активність до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів проявляли штами: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 17/2, *L. acidophilus* 49/1.

З'ясовано, що найвищий рівень адгезії досліджувані бактерії роду *Lactobacillus* проявляли до еритроцитів крові кролика, що в середньому становив 83 %.

У дослідах *in vivo* на лабораторних мишах встановлено позитивний ефект використання з метою профілактики сальмонельозних інфекцій молока, ферментованого штамом бактерій *L. helveticus* 13/2. Введення тваринам молочнокислих бактерій дало змогу зберегти від 73 до 100 % дослідних мишей, інфікованих бактеріями *Salmonella typhimurium* № 89, та від 67 до 90 % тварин, заражених бактеріями *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko*.

1. Arena M.P., Capozzi V., Spano G., Fiocco D. The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2017; 101(7): 2641–2657.
2. Centre for disease prevention and control et al. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. Scientific opinion of the European centre for disease prevention and control; Scientific opinion of the panel on biological hazards; Opinion of the Committee for medicinal products for veterinary use; Scientific opinion of the scientific committee on emerging and newly identified health risks. **ESA Journal**, 2009; 7(11): 1372.
3. Chiu Y.H., Lin S.L., Tsai J.J., Lin M.Y. Probiotic actions on diseases: implications for therapeutic treatments. **Food Funct**, 2014; 5(4): 625–634.
4. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol**, 1960; 23: 130–138.
5. Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, 2016; 14(1): 20–32.
6. Enrica P. **Interactive probiotics**. Department of Life Sciences and Systems Biology University of Torino. Italy: CRC Press, 2014. P. 274.
7. Hill C., Guarner F., Reid G. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, 2014; 11(8): 506–514.

8. *Irkitova A.N., Kagan, Ya.R.* Methods for determining the antagonistic activity of lactic acid bacteria. **Actual problems of machinery and technology of milk processing**, 2012, 9: 226–236. (In Russian).
9. *Lavrik G.S.* Characterization of the adhesive properties of lactobacilli-clinical isolates and constituent biologics. **Annals of the Mechnikov Institute**, 2015, 2: 200–203. (In Ukrainian).
10. Law of Ukraine “On Veterinary Medicine” dated November 16, 2006 No. 361-V (with amendments as of September 18, 2008 No. 538-VI).
11. *Lensen H., Roos S., Jonsson H. et al.* Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus *in vitro*. **Microbiology**, 2014, 160(4): 671–681.
12. *Motulsky H.* **Intuitive biostatistics: a nonmathematical guide to statistical thinking**. USA, Oxford University Press, 2014. P. 517.
13. *Pohilko Yu.M., Kravchenko N.O.* Composition of the microbocenosis of the gastrointestinal tract of young rabbits depending on the diet. **Scientific and Technical Bulletin**, 2016; 17(1): 141–146. (In Ukrainian).
14. *Pokhilko Yu. M., Kravchenko N.O.* Isolation from the digestive system of rabbits lactic acid bacteria, promising for the development probiotic preparations. **Biological Resources and Nature Management**, 2016; 8(5–6): 63–66. (In Ukrainian).
15. *Reznikov A.* Ethical problems in carrying out experimental medical and biological studies in animals. **Bulletin of the National Academy of Sciences of Ukraine**, 2001, 11: 30–33. (In Ukrainian).
16. *Romanov V.E., Ivonin A.G., Bondarenko A.L., Oborin V.A., Nekhoroshkina E.L.* **[Method of identification of the Bacteria-Binding Activity of Erythrocytes]**. Patent 2360969. (In Russian).
17. *Shakhmardanov M.Z.* On the issue of antibacterial therapy of the gastrointestinal form of salmonellosis. **Epidemiology and Infectious Diseases**, 2013;1: 4–7. (In Russian).
18. *Zaritsky A.M., Glushkevich T. G., Bubalo, V.O.* The actuality of salmonella in Ukraine and the prospect of combating it. **Infectious Diseases**, 2016, 3: 5–9. (In Ukrainian).

PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIA OF *LACTOBACILLUS* GENUS ISOLATED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF RABBITS

Yu. M. Pohilko, N. O. Kravchenko

*Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS of Ukraine
97, Shevchenko St., Chernihiv 14027, Ukraine
e-mail: pohilko.yura@gmail.com*

The probiotic properties (antagonistic and adhesion) of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits were studied. It was established that the studied antagonistic activity to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms was observed in the following strains: *Lactobacillus lactis* 4/1, *Lactobacillus casei* 5/4, *Lactobacillus helveticus* 13/2, *Lactobacillus plantarum* 17/2, *Lactobacillus plantarum* 17/3, *Lactobacillus acidophilus* 49/1. The level of adhesion of lactic acid bacteria isolate, isolated from the gastrointestinal tract of rabbits, to erythrocytes of rabbit, mouse, pig, cattle, human blood was studied. The highest level of adhesion (83 %) was observed in erythrocytes of rabbits, low (53 %) – in erythrocytes of cattle. The possibility of using the *L. helveticus* 13/2 strain for the prevention and treatment of salmonella infections has been shown. Introduction to research animals of lactic acid bacteria before infection

with pathogens of salmonellosis allowed to save 90–100 % of experimental animals. With the use of lactic acid bacteria after infection of salmonellosis to animals, the safety of the herd was 67–73 %.

Keywords: probiotics, lactic acid bacteria, antagonistic activity, adhesion, salmonellosis

Одержано: 16.12.2017