

ДІАГНОСТИКА, ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКА ХВОРОБ ТВАРИН

DIAGNOSTICS, TREATMENT AND PROPHYLACTICS OF ANIMAL DISEASES

УДК 363.087.8:579.264:579.222.3

Агеєв В. О., Дерев'янку С. В. ©

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, Чернігів

ФАКТОРИ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ — КОМПОНЕНТІВ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ БПС-44 ТА БПС-Л

*Встановлено фактори, що обумовлюють антагоністичну активність пробіотичних штамів бактерій — компонентів пробіотиків БПС-44 та БПС-Л. Для молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* L5 — це продукція молочної кислоти і лізоциму, для штамів аеробних бацил *Bacillus subtilis* B3 і 44-р — антибіотичних речовин та, меншою мірою, органічних кислот і лізоциму.*

Ключові слова: *пробіотичні препарати, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, антагонізм, молочна кислота, лізоцим.*

Вступ. Нормальна мікрофлора розглядається як якісне і кількісне співвідношення популяцій мікробів організму, що підтримують біохімічну, метаболічну та імунологічну рівновагу організму хазяїна, необхідну для збереження його здоров'я. Нормальна мікрофлора виконує ряд важливих функцій: колонізаційно-резистентну (міжмікробний антагонізм, активація імунітету), детоксикаційну, синтетичну і травну.

У тваринництві та ветеринарній медицині застосовуються пробіотичні препарати, створені на основі представників нормальної мікрофлори — переважно аеробних бацил та молочнокислих бактерій [11; 12]. Їх широке застосування зумовлене високою антагоністичною активністю до патогенних та умовно-патогенних бактерій, здатністю до адгезії на клітинах шлунково-кишкового тракту, їх імуномодуючими властивостями, здатністю продукувати спектр біологічно активних речовин, вітамінів, незамінних амінокислот тощо [1; 5].

Антагонізм представників нормальної мікрофлори обумовлюється продукцією природних антибіотичних речовин, органічних кислот, лізоциму, гідроген пероксиду та інших бактеріоцинів, які мають широкий спектр антимікробної дії [15], що зумовлює високу лікувально-профілактичну ефективність пробіотичних препаратів.

Отже, пробіотики — це ефективні лікувально-профілактичні препарати, їх дія на макроорганізм різнобічна. Потрапляючи в шлунково-кишковий тракт, вони продукують біологічно активні речовини, які згубно діють на патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми. Застосування пробіотиків необхідне для відновлення нормофлори організму після проведення антибіотикотерапії. Безпечність пробіотиків визнана Всесвітньою організацією охорони здоров'я та разом з Продовольчою і сільськогосподарською організацією ООН розроблені вимоги до безпеки пробіотичних штамів мікроорганізмів [10; 14].

Матеріали і методи. У досліджах використовували однокомпонентний бацилярний препарат субтиліс БПС-44 (реєстраційне посвідчення № 2154-04-0254-06 від 24.11.2006 р.), виготовлений на основі штаму бактерій *Bacillus subtilis* 44-р (депонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів 17.05.2002 р. за реєстраційним номером 141) та двокомпонентний бацилярний препарат субтиліс-лакто БПС-ЛІ (проект ТУ розглянуто та затверджено Вченою радою Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН 8.11.2005 р.), до складу якого входять штам бактерій *B. subtilis* В3 (депонований у Депозитарії ДНКІБШМ 23.06.2009 р. за реєстраційним номером 480) та штам бактерій *Lactobacillus plantarum* L5 (депонований у Депозитарії ДНКІБШМ 23.06.2009 р. за реєстраційним номером 479).

При визначенні антагоністичної активності пробіотичних штамів бактерій та концентрації лізоциму як тест-культури використовували патогенні штами бактерій *Staphylococcus aureus* 23, *Escherichia coli* 14/1, *Salmonella typhimurium* 12, *Shigella sonnei* 22, *Micrococcus lysodeikticus* 4/7 з колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН.

Культивування штамів аеробних бацил та більшості тест-культур (окрім *M. lysodeikticus*) здійснювали на м'ясо-пептонному агарі (МПА) [8], штаму молочнокислих бактерій — на бульоні MRS (середовищі де Мана) [13], тест-культури *M. lysodeikticus* — на біфталатному агарі [2].

Антагоністичну активність пробіотичних штамів бактерій визначали методом перпендикулярних штрихів, що полягає у підсіванні тест-культур до виростих на щільному живильному середовищі штрихів досліджуваних штамів бактерій (відстрочений антагонізм) [3]. Загальну концентрацію кислот у культуральній рідині визначали прямим кислотно-лужним титруванням [9], співвідношення та концентрацію органічних кислот — методом диференційної відгонки, що полягає у дистиляції безцукрового екстракту культуральної рідини з подальшим кислотно-лужним титруванням дистилятів [4], концентрацію лізоциму (КФ 3.2.1.17) — нефелометричним методом за Х. Перрі [6]. Математичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [7].

Результати дослідження. Антагоністична активність пробіотиків до патогенних бактерій. Встановлено, що пробіотичний штам *Lactobacillus plantarum* L5 на живильному середовищі з 2 % глюкози характеризується високою антагоністичною активністю до використаних патогенних тест-культур, зумовлюючи затримку росту останніх 14,5–18,6 мм, без глюкози —

0,8–1,3 мм. Ці дані дають підстави вважати, що з факторів, які можуть обумовлювати антагоністичну активність, досліджуваним штамом молочнокислих бактерій продукуються переважно органічні кислоти.

У випадку штамів аеробних бацил *Bacillus subtilis* 44-р та В3 проявляється протилежна тенденція. Так, *B. subtilis* В3 на середовищі без глюкози виявляє значну антагоністичну активність, затримуючи ріст патогенних тест-культур на відстані 5,1–10,2 мм, що у 2,2–4,9 раза більше, ніж на середовищі з 2 %-ним вмістом глюкози (2,1–2,8 мм). Стосовно штаму *B. subtilis* 44-р, то він обумовлює пригнічення росту тест-культур на відстані 5,8–9,3 мм, яке так само вірогідно відрізняється від відповідних значень затримки росту у випадку використання середовища з глюкозою у 2,5–4,7 раза (табл. 1), що спонукає до вивчення особливостей кислотоутворення досліджуваними штамми.

Таблиця 1

Антагоністична активність досліджуваних штамів бактерій

Штами	Живильне середовище	Зони затримки тест-культур, мм ($M \pm m$, $n = 8$)			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Bacillus subtilis</i> 44-р	МПА	6,0±0,5	5,8±0,7	9,3±0,3	7,8±1,2
	МПА з 2 % глюкози	1,6±0,4*	2,3±0,5*	2,0±1,0*	1,9±0,4**
<i>Bacillus subtilis</i> В3	МПА	6,7±0,3	5,1±0,2	7,5±0,7	10,2±0,9
	МПА з 2 % глюкози	2,8±0,3**	2,3±0,3*	2,0±0,3*	2,1±0,4**
<i>Lactobacillus plantarum</i> L5	МПА	1,3±0,3	1,2±0,3	0,8±0,2	1,1±0,4
	МПА з 2 % глюкози	14,8±1,1***	14,5±0,9***	18,6±1,2***	16,1±1,0***

Примітка: вірогідна різниця порівняно з відповідним середовищем без вуглеводів: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Такі відмінності пояснюються тим, що їх антагоністична активність обумовлена речовинами антибіотичної природи, для синтезу яких не потрібно великої кількості легкодоступних джерел вуглеводів, і утворення яких може пригнічуватися при достатній концентрації у середовищі глюкози.

Динаміка кислотоутворення штамми бактерій — компонентами пробіотиків БПС-44 та БПС-Л. Для вивчення накопичення кислот у культуральній рідині та їх співвідношення використовували стандартні рідкі живильні середовища — МПБ та МПБ з додаванням 2 % глюкози.

Досліджувані аеробні бацили впродовж 24 год. у середовищі без глюкози продукують кислоту до кінцевої концентрації 11,3–11,9 мм Н⁺, вже з 2-ї доби концентрація кислоти у культуральній рідині починає зменшуватися, повертаючись до початкового рівня на 4–5-ту добу культивування, а починаючи із 6-ї доби зниження концентрації кислоти прискорюється у 2,6–3,3 раза. При культивуванні досліджуваного штаму молочнокислих бактерій вже з 1-ї доби культивування вміст кислоти у середовищі підвищується і упродовж 7 діб її концентрація зберігається на рівні 12,7–14,0 мм Н⁺.

При культивуванні у живильному середовищі з 2 %-ним вмістом глюкози штами бактерій *Bacillus subtilis* 44-р та В3 за першу добу культивування накопичують у культуральній рідині органічні кислоти у концентрації 19,6 мМ Н⁺, що суттєво перевищує кількість кислот, накопичених упродовж відповідного періоду при вирощуванні цих штамів на середовищі без глюкози. Упродовж 5 діб культивування рівень кислотності середовища майже не змінюється, а з 6-ї доби починає поступово знижуватися — на 1,0–1,6 мМ Н⁺ за добу. При культивуванні штаму *Lactobacillus plantarum* L5 концентрація органічних кислот у культуральній рідині зростає впродовж 7 діб зі швидкістю, яка коливається від 0,9 до 4,6 мМ Н⁺ за добу.

Отже, загальна динаміка накопичення органічних кислот у культуральній рідині досліджуваними штамми залежить від належності пробіотичних штамів до певних груп мікроорганізмів.

Той факт, що на середовищі з глюкозою аеробні бацили на першу добу культивування продукують більше органічних кислот, ніж молочнокислі бактерії, поступаючись при цьому останнім за антагоністичною активністю, може пояснюватися кількісним співвідношенням утворених кислот, що мають різну бактерицидну та бактериостатичну активність.

Встановлено, що після 7 діб культивування на середовищі, що не містить глюкози, штами *Bacillus subtilis* 44-р і В3 продукують оцтову кислоту у кінцевій концентрації 0,13–0,18 % та масляну — у концентрації 0,28–0,31 %, а при їх культивуванні на середовищі з 2 % глюкози оцтової кислоти накопичується у 2,7–3,2 рази більше (до 0,42–0,48 %), масляна кислота відсутня, крім того накопичується молочна кислота у концентрації 2,14–2,32 % (табл. 2). Серед досліджуваних органічних кислот найбільшу бактерицидну дію має молочна кислота, яка продукується цими штамми бактерій лише за наявності у живильному середовищі достатньої кількості вуглеводів. А враховуючи те, що аеробні бацили при вирощуванні на МПБ без глюкози більш виражено проявляють антагонізм до патогенів, отримані дані підтверджують попереднє припущення щодо продукції аеробними бацилами антибіотичних речовин.

Таблиця 2

Співвідношення органічних кислот, накопичених пробіотичними штамми у культуральній рідині (M±m, n = 6)

Штами	Середовища (позначення)	Концентрація органічних кислот, %		
		оцтової	масляної	молочної
<i>Bacillus subtilis</i> 44-р	МПБ	0,13±0,02	0,28±0,12	0,00±0,00
	МПБ з 2 % глюкози	0,42±0,03**	0,00±0,00**	2,14±0,13**
<i>Bacillus subtilis</i> В3	МПБ	0,18±0,07	0,31±0,09	0,00±0,00
	МПБ з 2 % глюкози	0,48±0,06*	0,00±0,00**	2,32±0,17**
<i>Lactobacillus plantarum</i> L5	МПБ	0,42±0,12	0,00±0,00	0,23±0,02
	МПБ з 2 % глюкози	0,17±0,04*	0,00±0,00	4,31±0,11***

Примітка: вірогідна різниця порівняно з відповідним середовищем без вуглеводів: * — p < 0,05; ** — p < 0,01; *** — p < 0,001.

Щодо штаму *Lactobacillus plantarum* L5, то при вирощуванні на середовищі, яке не містить моноцукрів, відбувається накопичення у культуральній рідині оцтової та молочної кислот у концентраціях 0,42 % і 0,23 % відповідно. Водночас у середовище з 2 % глюкози досліджуваний штам бактерій виділяє оцтової кислоти у 2,5 раза менше, а молочної кислоти — у 18,7 раза більше, до концентрації 4,31 %.

Продукція бактеріоцинів бактеріальними компонентами пробіотичних препаратів. Лізоцимну активність пробіотичних штамів бактерій вивчали на тих самих середовищах, що і кислотоутворення, визначення концентрації лізоциму здійснювали у центрифугаті культуральної рідини.

Дослідження показали, що склад середовища для культивування аеробних бацил практично не впливає на концентрацію лізоциму у культуральній рідині, яка складає 2,40–3,15 мкг/см³.

Штам *Lactobacillus plantarum* L5 на середовищі з 2 %-ним вмістом глюкози продукує лізоцим у 2,4 рази активніше, ніж на аналогічному середовищі без глюкози — до концентрації 12,65 мкг/см³ порівняно з 5,30 мкг/см³ при вирощуванні штаму на МПБ без глюкози (табл. 3).

Отже, результати вивчення механізмів антагоністичної дії пробіотичних штамів мікроорганізмів свідчать, що антагоністична активність молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* L5 обумовлюється продукцією молочної кислоти та лізоциму; штамів аеробних бацил *Bacillus subtilis* В3 та 44-р — антибіотичних речовин та частково органічних кислот і лізоциму.

Таблиця 3

Концентрація лізоциму у культуральній рідині, мкг/см³ (M±m, n = 6)

Пробіотичні штами	Середовища (позначення)	
	МПБ	МПБ з 2 % глюкози
<i>Bacillus subtilis</i> 44-р	2,95±0,35	3,15±0,20
<i>Bacillus subtilis</i> В3	2,65±0,25	2,40±0,15
<i>Lactobacillus plantarum</i> L5	5,30±0,65	12,65±1,05**

Примітка: ** — вірогідна різниця порівняно з відповідним середовищем без вуглеводів, $p < 0,01$.

Висновки. 1. Штами бактерій, що є основою пробіотиків БПС-44 та БПС-Л, володіють помірною та високою антагоністичною активністю щодо низки патогенних мікроорганізмів.

2. Антагоністична активність бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* L5 обумовлюється продукцією молочної кислоти та лізоциму, штамів *Bacillus subtilis* В3 та 44-р — антибіотичних речовин та, дещо менше, органічних кислот і лізоциму.

Література

1. α -амілази *Bacillus subtilis* / [Л. Д. Варбанець, К. В. Мишак, О. В. Мацелюх та ін.] // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 2. — С. 30–38.
2. Вихоть Н. Е. Факторы естественной резистентности / Н. Е. Вихоть, Е. У. Пастер // Иммунология : практикум / Е. У. Пастер, В. В. Овод,

- В. К. Позур, Н. Е. Вихоть. — К. : Выща шк. Изд-во при Киев. гос. ун-те, 1989. — С. 265–297.
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учеб. для студ. биол. спец. ун-тов. / Н. С. Егоров — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1986. — 448 с.
 4. Зоотехнический анализ кормов / Е. А. Петухова, Р. Ф. Бессарабова, Л. Д. Халенева, О. А. Антонова. — 2-е изд., доп. и перераб. — М. : Агропромиздат, 1989. — 239 с.
 5. Квасников Е. И. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий по отношению к возбудителям кишечных заболеваний домашних птиц / Е. И. Квасников, Т. Н. Шишлевская, Н. К. Коваленко // Микробиол. журн. — 1983. — Т. 45, № 5. — С. 27–32.
 6. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Медицина, 1978. — 392 с.
 7. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин : учеб. пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.
 8. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; [пер. с англ. Е. Н. Кондратьевой и Л. В. Калакуцкого] : в 3 т. — М. : Мир, 1983–1984. — Т. 3. — 1984. — 264 с.
 9. Пискарёва С. К. Аналитическая химия: учеб. для сред. спец. учеб. заведений / С. К. Пискарёва, К. М. Барашков, К. М. Ольшанова. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1994. — 384 с.
 10. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria : report of a joint FAO/WHO expert consultation. — Córdoba : FAO/WHO, 2001. — 33 p.
 11. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics / [Irina V. Pinchuk, Philippe Bressollier, Bernard Verneuil et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2001. — Vol. 45, № 11. — P. 3156–3161.
 12. Kizerwetter-Świda M. Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria / Magdalena Kizerwetter-Świda and Marian Binek // Polish journal of microbiology. — 2005. — Vol. 54, № 4. — P. 287–294.
 13. de Mann J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Mann, M. Rogosa, M. Elisabeth Sharpe // Journal of applied bacteriology. — 1960. — Vol. 23, № 1. — P. 130–135.
 14. Potential uses of probiotics in clinical practice / Gregor Reid, Jana Jass, M. Tom Sebulsky, John K. McCormick // Clinical microbiology review. — 2003. — Vol. 16, № 4. — P. 658–672.
 15. Todorov S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* — production, genetic organization and more of action / Svetoslav D. Todorov // Brazilian journal of microbiology. — 2009. — Vol. 40, № 2. — P. 209–221.

Summary

Aheyev V. O., Derevyanko S. V.

Institute of agricultural microbiology, UAAS, Chernihiv, Ukraine

**THE ANTAGONISTIC FACTORS OF THE STRAINS OF BACTERIA —
THE COMPONENTS OF BPS-44 AND BPS-L PROBIOTIC DRUGS**

*The paper shows the factors that determined antagonistic activity of the probiotic strains of bacteria — the components of BPS-44 and BPS-L probiotics. For a lactic acid bacteria strain *Lactobacillus plantarum* L5 it was the production of lactic acid and lysozyme, aerobic bacilli strains *Bacillus subtilis* B3 and 44-p — antibiotic substances and partially organic acids and lysozyme.*

Key words: *probiotic drugs, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, antagonism, lactic acid, lysozyme.*

Стаття надійшла до редакції 12.04.2010