

УДК 619:616.34–008.34.44[615.246.2+615.281.9]:636.71.8

**П. А. РУДЕНКО**, кандидат ветеринарних наук

*Луганський національний аграрний університет (м. Луганськ)*

**В. О. УШКАЛОВ**, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент  
НААН України

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів  
мікроорганізмів (м. Київ)*

## **ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ**

*У статті наведені дані щодо характеристики біологічних властивостей виробничих штамів лактобактерій, які входять до складу комплексних пробіотично-сорбційних препаратів «Ділаксил» і «Сорбелакт». Встановлено, що виробничі штами *L. plantarum* №22, *L. rhamnosus* №26 і *L. acidophilus* №24 за морфо-тинкторіальними, культуральними, біохімічними, біологічними властивостями є типовими і цілком придатні для використання при виготовленні комплексних пробіотичних препаратів для лікування та профілактики котів з септичними процесами.*

*Ключові слова: лактобактерії, біологічні властивості, пробіотик, септичні процеси, коти.*

Нормальна мікрофлора є чутким індикатором фізіологічного стану макроорганізму за дії на нього різноманітних негативних факторів. Функції мажорної мікрофлори організму різноманітні. Вона сприяє синтезу незамінних амінокислот, продукує різні вітаміни - В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, РР, К, С, Е, пантетонову кислоту, біотин. Мажорна мікрофлора повністю забезпечує потребу макроорганізму у вітамінах В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> і Н, причому вітамін В<sub>12</sub> в природних умовах синтезується тільки мікроорганізмами [1].

Індигенні мікроорганізми беруть активну участь у синтезі різноманітних біологічно активних речовин. Вони регулюють газоутворення, водно-сольовий обмін, перистальтику кишечника, виконують морфокінетичну, дезінтоксикаційну, імуногенну роль. Мажорна мікрофлора - важлива метаболічна система, що синтезує і руйнує власні і чужорідні субстанції, вона бере участь у адсорбції і перенесенні в організм тварини корисних речовин, перешкоджаючи проникненню потенційно шкідливих агентів. Мажорна мікрофлора вносить значний внесок у морфогенез тканин, метаболізм вуглеводів і азотистих сполук [2].

Вважають, що складені симбіотичні відносини макроорганізму з представниками мажорної аутофлори є основою імунологічного гомеостазу. Так, В. Т. Івашкин [3] вказує, що контакт мажорної мікрофлори з патогенними бактеріями активує імунну систему шляхом експресії

прозапальних генів та секретії цитокинів і хемокінів. Встановлено, що представники мажорної мікрофлори оказують стимулюючий вплив на імунологічний статус: збільшують кількість Т-лімфоцитів, активізують функцію В-лімфоцитів та підвищують фагоцитарну активність нейтрофілів [4].

Представники пробіотичної мікрофлори позитивно впливають на еритрогемопоез, сприяють збільшенню у крові лейкоцитів і гемоглобіну в межах фізіологічної норми, активізують ліпідний, вуглеводний та мінеральний обмін [5].

Нами знайдено повідомлення R. A. Kekkonen, N. Lummela, H. Karjalainen [6], які вказують на те, що представники біфідо- та лактобактерій володіють протизапальними властивостями. A. Ortiz-Andrellucchi, A. Sanchez-Villegas, C. Rodriguez-Gallego [7] повідомляють, що *Lactobacillus casei* сприяє модуляції імунної відповіді. Деякі дослідники [8-10] говорять про те, що пробіотики підвищують антиоксидантний потенціал організму. Інші дослідники [11, 12] констатують, що представники молочно-кислих бактерій володіють антивірусною дією. Н. В. Харченко, В. В. Черненко, Д. С. Янковський [2] наголошують, що нормофлора макроорганізму володіє антиканцерогенною та антимутагенною активністю.

Однією з основних функцій мажорної мікрофлори, що забезпечує колонізаційну резистентність організму, є адгезія мікробів до рецепторів слизової оболонки кишечника. Здатність штамів мажорної аутофлори зв'язуватися з рецепторами поверхні слизової оболонки забезпечує конкуренцію за ці рецептори з патогенними та умовно патогенними мікроорганізмами [13-15].

Представники бактерій мажорної нормофлори мають виражену антагоністичну активність відносно патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Поняття антагоністична активність дуже ємке і складається з багатьох складових: висока швидкість розмноження, більш широкий набір ферментів, продукція різних бактерицидних і бактеріостатичних субстанцій [16-18].

Серед речовин, які продукуються лакто- і біфідобактеріями, особливе місце займають органічні жирні кислоти, які володіють високою антагоністичною активністю по відношенню до патогенних мікроорганізмів. Біфідо-, лактобактерії, кишкові палички здатні до синтезу бактеріоцинів (лактобrevін, лактоцин, лактолін, лактоцідін, плантаріцин, коліцин, гелветіцин, болгаріцин, реутерін) - природних антибіотикоподібних речовин. Так, субстанції, що виділяються мажорною мікрофлорою, інгібують ріст ентеробактерій, клостридій, лістерій, стрептококів і грибів роду *Candida* [5].

Слід відзначити, що представники нормальної мікрофлори володіють природною стійкістю до антибактерійних засобів, що обумовлює їх використання разом з антибіотиками [19].

Лабільність мажорної мікрофлори багато в чому залежать від змін мікросередовища поверхонь шкіри і слизових оболонок. Завдяки таким змінам може порушуватись баланс між видами мікроорганізмів, внаслідок чого виникають дисбіотичні стани. Однак, як правило, мажорна мікрофлора досить стійка до змін середовища. Вона здатна знову заселяти звичні ділянки після короткочасного порушення поверхневого мікросередовища і може відігравати значну роль у захисті організму від впровадження вірулентних патогенів [20, 21].

У нормі, перебуваючи у стані динамічної рівноваги з мажорною аутофлорою, представники мінорної мікрофлори не чинять негативного впливу на організм. Проте, внаслідок різних порушень (незбалансована годівля, зсув імунобіологічного статусу, прийом антибактеріальних препаратів, інфекційний процес, стрес, травма, гнійні рани, сепсис тощо), представники мінорної мікрофлори починають посилено розмножуватися і у зв'язку з транслокацією можуть заселяти нетипові для них екологічні ніші організму, стаючи причиною інфекційних процесів різної локалізації [22-24].

Отже мажорна мікрофлора в організмі тварини формує його колонізаційну резистентність, яка перешкоджає появі дисбіотичних порушень, що обумовлює виникнення різних патологічних станів. Тому для більш ефективної боротьби з інфекційними та септичними процесами необхідно формувати оптимально збалансовані мікробіоценози за допомогою пробіотичних біопрепаратів.

Виходячи з вищесказаного **метою** даного дослідження стала характеристика біологічних властивостей виробничих штамів лактобактерій, які входять до складу комплексних пробіотично-сорбційних препаратів «Ділаксил» і «Сорбелакт».

**Матеріал і методи.** Матеріалом для дослідження були 18 клінічно здорових котів, які знаходились у притулку для бездомних тварин ЗАТ «Ясинуватського машинобудівельного заводу» м. Ясинувате Донецької області. Ізоляцію мікроорганізмів проводили на базі лабораторії вивчення факторних інфекцій тварин Луганського НАУ. Подальшу ідентифікацію ізольованих мікроорганізмів від піддослідних котів за біохімічними властивостями проводили згідно «Определителя бактерий Берджи» [25].

При проведенні бактеріологічних досліджень нами було віділено 37 (17,3 %) штамів молочнокислих мікроорганізмів від загальної кількості вилучених культур, які були віднесені до родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

Виробничі штами *L. plantarum* №22, *L. rhamnosus* №26 і *L. acidophilus* №24 були ізольовані нами при вивченні мікробної популяції екологічних ніш організму, а саме з проб фекалій і біоптату здорової шкіри, відібраних від клінічно здорових котів. Ізоляти мікроорганізмів *L. plantarum* 22 і *L. acidophilus* 24 були вилучені із розведень фекалій  $10^5$ , а штам *L. rhamnosus* 26 – з біоптату здорової шкіри, відібраних від клінічно здорових котів.

**Результати досліджень.** Відбір штамів мікроорганізмів, придатних для виробництва пробіотиків, є визначальним етапом під час розроблення біологічних препаратів й потребує методично правильного проведення досліджень з використанням сучасних методів. Виробничі штами повинні володіти широким спектром антагоністичної дії, високою адгезивною активністю, резистентністю до антимікробних засобів, стійкістю до агресивного середовища макроорганізму, відсутністю генетичної спорідненості з облігатними та умовно патогенними мікроорганізмами, а також безпечністю (нешкідливістю) для тварин. Тому ми вирішили надати коротку характеристику біологічних властивостей обраних виробничих штамів лактобактерій.

Результати вивчення біологічних властивостей виробничих штамів лактобактерій представлені в таблиці.

Таблиця

### Характеристика біологічних властивостей виробничих штамів лактобактерій

Біологічні маркери мікроорганізмів	Виробничі штами лактобактерій		
	<i>L. plantarum</i> 22	<i>L. acidophilus</i> 24	<i>L. rhamnosus</i> 26
Фарбування за Грамом	Г <sup>+</sup>	Г <sup>+</sup>	Г <sup>+</sup>
Морфологічна характеристика	палички правильної форми із закругленими кінцями	палички правильної форми із закругленими кінцями	палички правильної форми із прямокутними кінцями
Спороутворення	–	–	–
Капсулоутворення	–	–	–
Продуктування каталази	–	–	–
Ріст на напіврідких середовищах	щіткоподібний ріст у нижній та середній частинах пробірки		
Ріст на твердих середовищах	дрібні, круглі, куполоподібні, гладкі, білувато-кремові полупрозорі колонії, тягучої консистенції	точкові, глибинні, шорсткі, блискучі, білі, непрозорі колонії з хвилясто-лопастними краями	дрібні круглі, гладкі, білі полупрозорі колонії з цільними краями, тягучої консистенції
Згортання знежиреного молока, год.	48-72	24-48	48-60
Утворення кислоти за Тернером, °	218	160	180
Патогенність	–	–	–
Антагоністична активність, ПАА, мм	26,0	26,8	24,6
Адгезивна активність, ІАМ	8,28	6,78	7,00

Примітка: Г<sup>+</sup> - грампозитивні; – - негативний результат.

Як видно з приведених в таблиці даних, за морфо-тинкторіальними властивостями у препаратах-мазках, пофарбованих за Грамом, ізоляти *L.*

*plantarum* №22, *L. rhamnosus* №26 і *L. acidophilus* №24 мали вигляд грампозитивних паличок правильної форми із закругленими, а у *L. rhamnosus* №26 із прямокутними кінцями. За розміром вони були в межах від 2 до 6 мкм і розташовувались у препаратах-мазках здебільшого поодинокі й попарно, іноді утворювали короткі завилісті ланцюжки різної довжини. Крім цього встановлено, що вказані штами є аспорогенними і нерухомими мікроорганізмами.

За культуральними властивостями штами *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* №24 віднесені до факультативних анаеробних мікроорганізмів. На живильному середовищі MRS-2 ці культури дають щіткоподібний ріст у нижній та середній частинах пробірки. За висіву їх на тверді живильні середовища, такі як MRS-4 і агар з гідролізованим молоком, виробничі штами *L. plantarum* № 22 і *L. rhamnosus* № 26 ростуть у вигляді дрібних, круглих, гладких, білих або білувато-кремових полупрозорих колоній з цільними краями, тягучої консистенції, а ізолят *L. acidophilus* 24 дає ріст у вигляді точкових, глибинних, непрозорих, блискучих, шорстких колоній білого кольору з хвилясто-лопатистими краями, м'якої консистенції.

Доведено, що за висіву штамів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 у знежирене молоко вони його згортають через 48-72, 48-60 і 24-48 годин відповідно з утворенням характерного міцного, рівного, суцільного згустку без пухирців газу, з приємним кисломолочним запахом і смаком. Зазначені штами віднесені до хемоорганотрофів, які потребують за культивування складні живильні середовища.

За біохімічними властивостями виробничі штами лактобактерій виявились гомоферментативними мікроорганізмами, що на середовищах Гіса окиснюють з утворенням кислоти без газу наступний ряд цукрів: *L. plantarum* № 22 (глюкозу, лактозу, мальтозу, арабінозу, сахарозу, маніт, рафінозу і фруктозу); *L. acidophilus* № 24 (глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, рафінозу, галактозу, саліцин і фруктозу); *L. rhamnosus* № 26 (галактозу, лактозу, мальтозу, маніт, сахарозу, сорбіт, фруктозу, глюкозу, рамнозу). До того ж виробничі штами *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 утворюють кислоту у знежиреному молоці з кислотністю за Тернером 218°, 180° і 160° відповідно.

При вивченні біологічних властивостей встановлено, що ізоляти мікроорганізмів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 не є патогенними за внутрішньочеревного введення для білих мишей, мурчаків, собак та котів у дозі 1 млрд. м. к.

При вивченні чутливості лактофлори до антибактерійних засобів, які широко використовуються в хірургічній практиці, встановлено, що виробничі штами *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 проявляють стійкість до антибіотиків групи β-лактамів, аміноглікозидів, лінкозамидів і фторхінолонів (за винятком гатіфлоксацину).

Необхідно відмітити, що за вивчення антагоністичної активності виробничих штамів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus*

№ 24 по відношенню до основних збудників хірургічної інфекції в котів встановлено, що вони володіють високими індексами ПАА, а саме 26,0; 24,6 і 26,8 мм відповідно. Крім цього, зазначені штами мають також високі показники адгезивної активності, про що свідчать їх індекси ІАМ, а саме 8,28; 7,00 і 6,78 відповідно.

Антигенні властивості виробничих штамів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 не вивчали.

Слід відзначити, що за вивчення стабільності основних біологічних властивостей виробничих штамів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 встановлено, що вони зберігають свою життєздатність у знежиреному молоці в умовах рефрижератору за температури +4-+6°C протягом 6 місяців. Крім цього, у зазначених штамів не спостерігається дисоціація протягом 6 місяців при періодичних пересівах у знежирене молоко, що свідчить про стабільність генетичних властивостей.

Для поточної підтримки виробничих штамів *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 проводили їх вирощування у пробірках із знежиреним молоком за температури 37°C на протязі 24-48 годин, рН середовища 7,0 і зберігали в холодильнику за температури +4-6°C. Для збереження життєдіяльності і біохімічних властивостей проводили пересіви культур на знежирене молоко через кожні 30-35 діб.

Таким чином, виробничі штами *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 і *L. acidophilus* № 24 за морфо-тинкторіальними, культуральними, біохімічними, біологічними властивостями є типовими і цілком придатні для використання при виготовленні комплексних пробіотичних препаратів для лікування та профілактики септичних процесів у котів.

### Список використаної літератури

1. Дука Є. Д. Діагностика та корекція дисбіозів кишечника в дітей / Є. Д. Дука // Українська медична газета. – 2006. – №6. – С. 22.
2. Применение мультипробиотика «Симбитер концентрированный» в лечении больных хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта / Н. В. Харченко, В. В. Черненко, Д. С. Янковский [и др.] // Здоровье женщины. – 2003. - №2(14). – С. 1-7.
3. Ивашкин В. Т. О роли антимикробных пептидов в механизмах врожденного иммунитета кишечника человека / В. Т. Ивашкин // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – №3.– С. 2-9.
4. Малик Н. И. Ветеринарные пробиотические препараты / Н. И. Малик, А. Н. Панин // Ветеринария. – 2001. - №1. – С. 46-50.
5. Получение новых пробиотиков и изучение их влияния на белковый обмен и формирование нормальной микрофлоры у поросят / Г. И. Новик, А. Н. Михалюк, А. А. Самарцев [и др.] // Биотехнология. – 2006. - №6. – С. 63-71.

6. Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults / R. A. Kekkonen, N. Lummela, H. Karjalainen [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2008. – №14(13). – P. 29-36.

7. Immunomodulatory effects of the intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* DN114001 in lactating mothers and their children / A. Ortiz-Andrellucchi, A. Sanchez-Villegas, C. Rodriguez-Gallego [et al.] // *Br. J. Nutr.* – 2008. - № 17. – P. 1-12.

8. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM) / S. Cenesiz, A. K. Devrim, U. Kamber [et al.] // *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* – 2008. - № 115(1). – P. 15-19.

9. *Kodali V. P.* Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium / V. P. Kodali, R. Sen // *Biotechnol. J.* – 2008. - № 3(2). –P. 245-251.

10. Fabian E. The effect of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on oxidant and antioxidant parameters in plasma of young healthy women / E. Fabian, I. Elmadfa // *J. Vitam. Nutr. Res.* – 2007. - №77(2). – P. 79-88.

11. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection / P.A. Maragkoudakis, W. Chingwaru, L. Gradisnik [et al.] // *J. Food. Microbiol.* – 2010. – № 4. – P. 145-151.

12. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection / P.A. Maragkoudakis, W. Chingwaru, L. Gradisnik [et al.] // *Int. J. Food. Microbiol.* – 2010. - №75. – P. 118-125.

13. Количественный способ оценки отсроченного антагонизма пробиотических культур против оппортунистических дрожжей / В. Г. Арзуманян, Н. А. Михайлова, А. А. Гайдеров [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2005. - №5. – С. 53-54.

14. Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women / S. P. Dimitonova, S. T. Danova, J. P. Serkedjieva [et al.] // *Anaerobe.* – 2007. – №3. – P. 219-224.

15. *Zarate G.* Protective effect of vaginal *L. paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *S. aureus* in a mouse animal model / G. Zarate, V. Santos, M. E. Nader-Macias // *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* – 2007. - №28. – P. 483-485.

16. Twetman S. Probiotics and oral health effects in children / S. Twetman, C. Steckslen-Blicks // *Int. J. Paediatr Dent.* – 2008.– № 18(1). – P. 3-10.

17. *Гужвинська С. О.* Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій-кандидатів у пробіотичні препарати / С. О. Гужвинська // *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.* - Львів. – 2007. – Вип.8. – С. 249-252.

18. *Стегний Б. Т.* Перспективы использования пробиотиков в животноводстве / Б. Т. Стегний, С. А. Гужвинская // Ветеринария. – 2005. - №11. – С. 10-11.
19. *Ocana V.* Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli / V. Ocana, C. Silva, M. E. Nader-Macias // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 2006. – P. 181-182.
20. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets / B. A. Hanselman, S.A. Kruth, J. Rousseau [et al.] // Can. Vet. J. – 2009.– № 50(9). – P. 954-958.
21. *Jin L.* Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea / L. Jin, L. Tao, S. I. Pavlova // J. Appl. Microbiol. – 2007. - №102(4). – P. 107-115.
22. *Никитушкина Н. А.* Видовой состав грибковой микрофлоры, персистирующей на коже животных с признаками дерматомикоза / Н. А. Никитушкина // Актуальные вопросы ветеринарной медицины. – Новосибирск. – 2005. – С. 48-49.
23. *Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs / S. Stepanovic, V. Dimitrijevic, D. Vukovic [et al.] // Veter. Microbiol. – 2001. – Vol.82. – P. 177-185.
24. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or leukemia virus / P. Sierra, J. Guillot, H. Jacob [et al.] // Am. J. Veter. Res. – 2000. – Vol.61. - №2. – P. 158-161.
25. *Хоулт Д.* Определитель бактерий Берджи / Хоулт Д., Криг И., Снит П. (пер. с англ.) – Москва, Мир. – 1997. – Т. 1,2. – 432 с.

**ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ/ П. А. Руденко, В. А. Ушкалов**

*В статье приведены данные относительно характеристики биологических свойств производственных штаммов лактобактерий, которые входят в состав комплексных пробиотико-сорбционных препаратов «Дилаксил» и «Сорбелакт». Установлено, что производственные штаммы *L. plantarum* № 22, *L. rhamnosus* № 26 и *L. acidophilus* № 24 по морфо-тинкториальным, культуральным, биохимическим, биологическим свойствам являются типичными и вполне пригодны для использования при изготовлении комплексных пробиотических препаратов для лечения и профилактики кошек с септическими процессами.*

*Ключевые слова:* лактобактерии, биологические свойства, пробиотик, септические процессы, кошки.



**CHARACTERISTICS OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF INDUSTRIAL LACTOBACILLI/ P. A. Rudenko, V. A. Ushkalov**

*The article presents data on the characteristics of the biological properties of industrial strains of lactic acid bacteria, which are part of the complex of probiotics-sorption of drugs "Dilaksil" and "Sorbelakt. Found that the production strains L. plantarum № 22, L. rhamnosus № 26 and L. acidophilus № 24 on the morpho-tinctorial, cultural, biochemical and biological properties are typical and are well suited for use in the manufacture of complex probiotic preparations for the treatment and prevention of cats with septic processes.*

*Key words: lactobacillus, biological properties, probiotic, septic processes, cat.*

**Рецензент – кандидат ветеринарних наук Л. М. Виговська**