

УДК: 636.09:579.864:57.083.1

Н. А. ПУСТОВІТ, аспірант*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

ВИВЧЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

*Лактобактерії є представниками нормальної мікрофлори молока і мають здатність стримувати розмноження умовно-патогенної мікрофлори за рахунок вироблення бактеріоцинів, молочної кислоти та інших біологічно активних речовин. У даній статті наведені результати вивчення антагоністичних властивостей ізолятів *Lactobacillus* виділених із молока здорових корів.*

Ключові слова: лактобактерії, антагонізм, молоко, мікрофлора, молочна кислота, ізоляти.

Сучасна галузь тваринництва і птахівництва розвивається дуже швидко. Доведено, що інтенсивна система вирощування тварин призводить до накопичення і активізації умовно-патогенної мікрофлори, та викривленню процесів формування кишкового мікробіотопа новонароджених тварин [1]. Застосування антибіотиків призводить до пригнічення не тільки патогенної, але і облігатної мікрофлори, внаслідок чого виникає дисбактеріоз.

Профілактику і лікування хвороб визваних умовно – патогенними та патогенними мікроорганізмами необхідно проводити стимулюванням природної резистентності організму. Одним з персективних напрямків в цій галузі стало застосування пробіотиків [2].

Використання пробіотиків є важливим елементом концепції здорового харчування населення і одним з найбільш ефективних шляхів профілактики порушення мікробіоцинозу шлунково – кишкового тракту, а також лікування вторинних розладів не тільки травної, але і імунної та ендокринної систем [3].

Антагоністичні властивості, які проявляють молочнокислі бактерії по відношенню до більшості сапрофітів і хвороботворних мікроорганізмів, обумовлені не тільки продукуванням кислот, але й виділенням специфічних антибіотичних речовин [4].

Нами виділені п'ять ізолятів лактобактерій; вивчено їх культурально – морфологічними, ферментативні властивостями, визначено резистентність до дії антибактеріальних речовин. Виділені штами стійкі до дії майже всіх відомих груп антибіотиків, відмічалась резистентність у досліджених культур до азолів, цефалоспоринов, макролідів, фторхінолів, тетрациклінів, аміноглікозидів, нітрофуранів.

Метою досліджень на даному етапі було вивчення антагоністичних властивостей ізолятів лактобактерій.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були п'ять польових ізоляти роду *Lactobacillus* та штами збудників харчових токсикоінфекцій із колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotubercu-*

losis, E.coli O157, Stafilococcus aureus ATCC 25923, Micrococcus flavus, Pseudomona saeruginosa 27/99, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium. Морфологічні властивості лактобактерій вивчали шляхом виготовлення мазків з добових бульйонних культур та фарбуванням їх за Грамом[5].

З метою вивчення культуральних властивостей культури культивували на рідкому і щільному середовищі МРС «Himedia» впродовж 24 год за температури 37°C.

Антагоністичні властивості визначали згідно методики; культивували на щільному середовищі при різних режимах інкубації штами – антагоністи та тест – культури[6].

Результати досліджень. Через 24 год після висіву на рідке поживне середовище МРС «Himedia» та культивування ліофільно-висушених культур ПН01, ПН02, ПН04, ПН06, ЛБ спостерігали ріст у вигляді помутніння середовища і осаду на дні пробірки, який при струшуванні легко розбивався, що характерно для роду *Lactobacillus*.

Через 24 год після висіву на рідке поживне середовище МРС «Himedia» та культивування ліофільно-висушених культур *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, E.coli O157, Stafilococcus aureus ATCC 25923, Micrococcus flavus, Pseudomona saeruginosa 27/99, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium* спостерігали ознаки росту, типові для даних видів мікроорганізмів (табл.1).

У мазках, виготовлених з добових бульйонних культур лактобактерій і пофарбованих за Грамом, спостерігали однорідні грампозитивні палички правильної форми розміщені поодинокі або скупченнями, розміром 1,5-2 мкм, що характерно для роду *Lactobacillus*.

У мазках, виготовлених з добових бульйонних культур штамів *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, E.coli O157, Stafilococcus aureus ATCC 25923, Micrococcus flavus, Pseudomona saeruginosa 27/99, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium* і пофарбованих за Грамом, спостерігали характерні для всіх культур характеристики, які відповідають їх видовим ознакам та паспортним даним штамів.

Таблиця 1

Культурально –морфологічні властивості культур

№ п/п	Штами	Рідке середовище МРС	Мазки за Грамом
1	2	3	4
1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	Легка каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні, 1х10 ⁹ КУО/см ³	Гр+ короткі палички 1-2,5х0,3-0,5 мкм
2.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 1,9х10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі палички 2-4х0,5-0,8 мкм
3.	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 1,8х10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі палички 2-4х0,5-0,8 мкм

Продовження таблиці 1

4.	<i>E.coli O157</i>	Інтенсивна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 4x10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі палички 4-6x0,6-0,9 мкм
5.	<i>Stafilococcus aureus ATCC 25923</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 1,9x10 ⁹ КУО/см ³	Гр+ кокова мікрофлора 2-4x0,5-0,8 мкм
6.	<i>Micrococcus flavus</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 1,1x10 ⁹ КУО/см ³	Гр+ кокова мікрофлора 2-4x0,5-0,8 мкм
7.	<i>Pseudomonasa eruginosa 27/99</i>	Інтенсивна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 3,4x10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі прямі палички 2-4x0,5-0,8 мкм
8.	<i>Salmonella enteritidis</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 2,9x10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі палички 2-4x0,5-0,8 мкм
9.	<i>Salmonella typhimurium</i>	Рівномірна каламуть, невелика кількість білого аморфного осаду, що легко розбивається при струшуванні 2,4x10 ⁹ КУО/см ³	Гр- короткі палички 2-4x0,5-0,8 мкм

Антагонізм лактобактерій по відношенню до *Listeria monocytogenes* (1), *Yersinia enterocolitica* (2), *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *E.coli O157* (4), *Stafilococcus aureus ATCC 25923* (5), *Micrococcus flavus* (6), *Pseudomona saeruginosa 27/99* (7), *Salmonella enteritidis* (8), *Salmonella typhimurium*(9) визначали висівом культур – антагоністів на щільне поживне середовище МРС «Німедіа» радіальними штрихами. Період інкубації склав 48 год при температурі 37°C [6].

Після 48 год культивування горизонтальними штрихами засіваємо штами із колекції. Період інкубації склав 24 год при температурі 37°C (табл. 2).

Таблиця 2

Антагоністична активність виділених культур

№	Штами	Виділені ізоляти, зона стерильності (мм)				
		ПН01	ПН02	ПН04	ПН06	ЛБ
1.	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
2.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-
3.	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	30	24	24	-	24
4.	<i>E.coli O157</i>	-	-	-	-	-
5.	<i>Stafilococcus aureus ATCC 25923</i>	-	-	-	-	-
6.	<i>Micrococcus flavus</i>	26	30	24	-	24
7.	<i>Pseudomonasa eruginosa 27/99</i>	-	-	-	-	-
8.	<i>Salmonella enteritidis</i>	26	34	30	20	30
9.	<i>Salmonella typhimurium</i>	22	28	22	-	24

Ізолят ПН01 проявив антагоністичні властивості до таких культур, як *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *Micrococcus sflavus* (6), *Salmonella enteritidis* (8), *Salmonella typhimurium* (9) (рис. 1, 2).

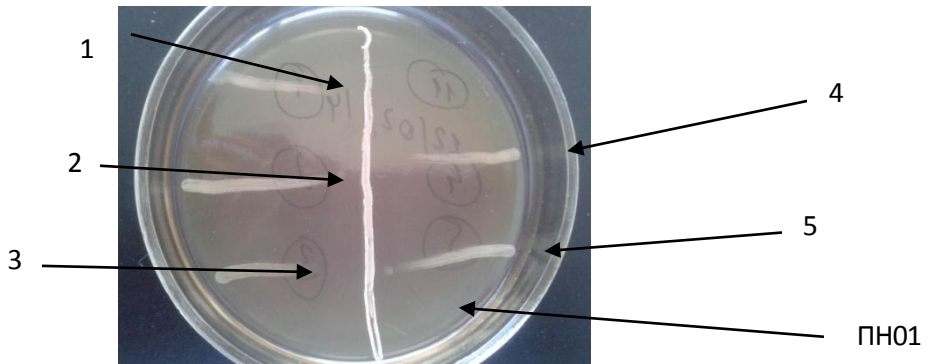


Рис. 1. Антагонізм ізолята ПН01 до *Yersinia pseudotuberculosis*, 30 мм (3)

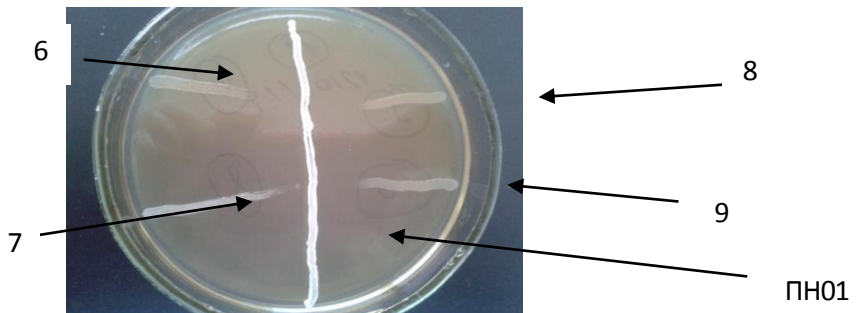


Рис. 2. Антагонізм ізолята ПН01 до *Micrococcus flavus*, 26 мм (6), *Salmonella enteritidis*, 26 мм (8), *Salmonella typhimurium*, 22 мм(9)

Ізолят ПН02 проявив антагоністичні властивості до таких культур, як *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *Micrococcus flavus* (6), *Salmonella enteritidis* (8), *Salmonella typhimurium* (9) (рис. 3, 4).

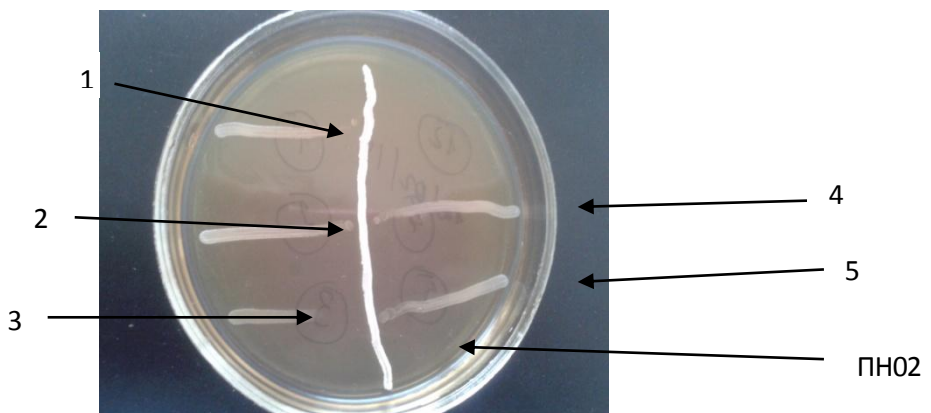


Рис. 3. Антагонізм ізолята ПН02 до *Yersinia pseudotuberculosis*, 24 мм (3)

Ізолят ПН04 проявив антагоністичні властивості до таких культур, як *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *Micrococcus flavus* (6), *Salmonella enteritidis* (8), *Salmonella typhimurium* (9) (рис. 5, 6).

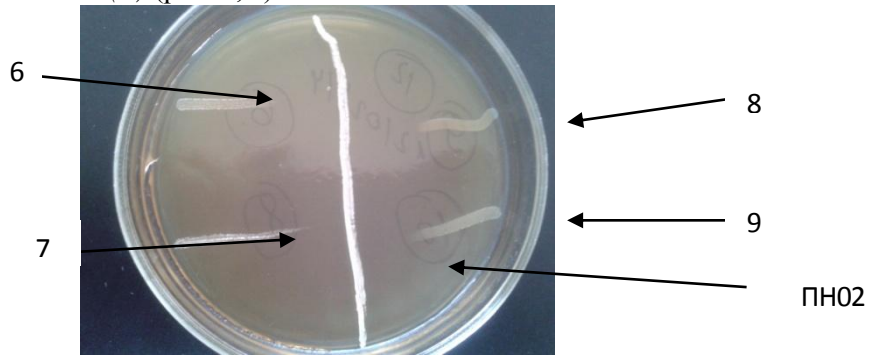


Рис. 4. Антагонізм ізолята ПН02 до *Micrococcus flavus*, 30 мм (6), *Salmonella enteritidis*, 34 мм (8), *Salmonella typhimurium*, 28 мм (9)

Ізолят ПН06 проявив антагоністичні властивості до таких культур, як *Salmonella enteritidis* (8) (рис. 7).

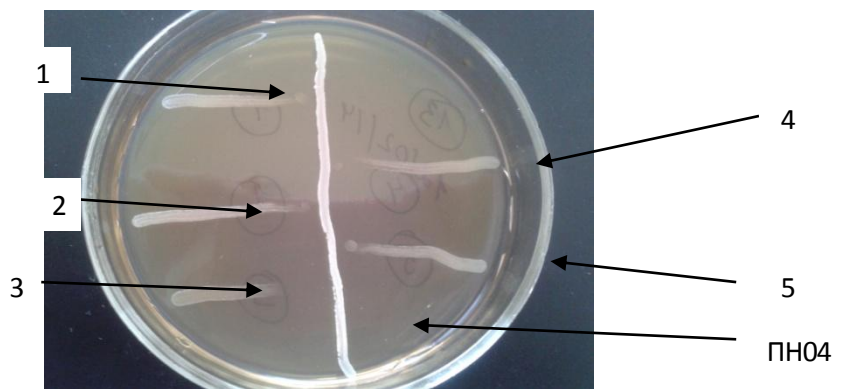


Рис. 5. Антагонізм ізолята ПН04 до *Yersinia pseudotuberculosis*, 24 мм (3)

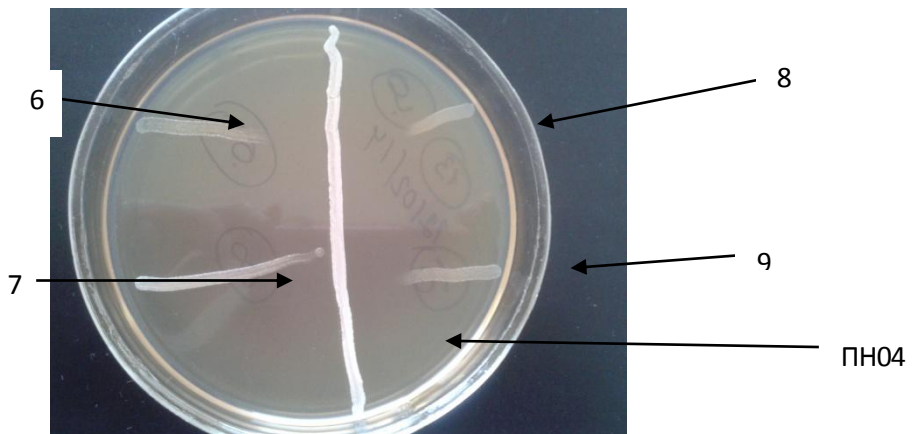


Рис. 6. Антагонізм ізолята ПН04 до *Micrococcus flavus*, 24 мм (6), *Salmonella enteritidis*, 30 мм (8), *Salmonella typhimurium*, 22 мм (9)

Ізолят ЛБ проявив антагоністичні властивості до таких культур, як *Yersinia pseudotuberculosis* (3), *Micrococcus flavus* (6), *Salmonella enteritidis* (8), *Salmonella typhimurium* (9) (рис. 8, 9).

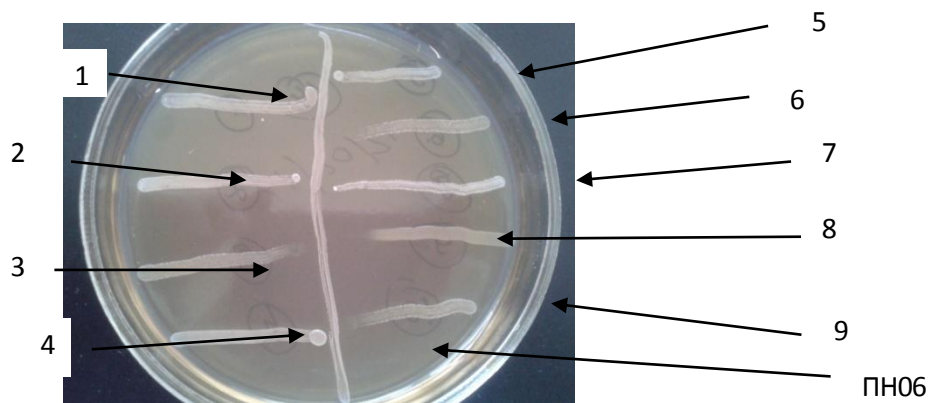


Рис. 7. Антагонізм ізолята ПН06 до *Salmonella enteritidis*, 20 мм (8)

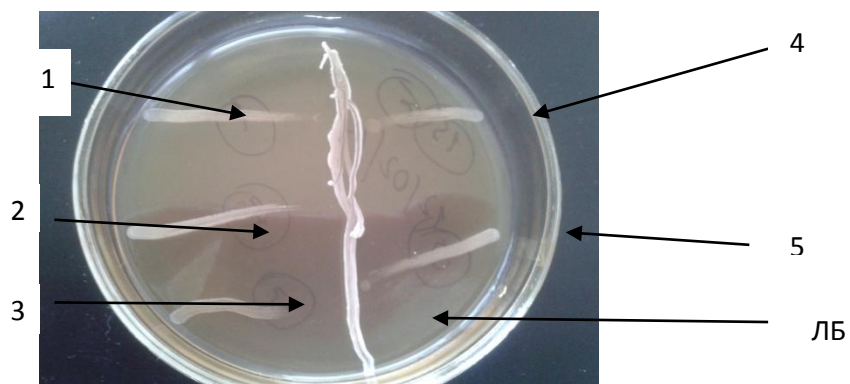


Рис. 8. Антагонізм ізолята ЛБ до *Yersinia pseudotuberculosis*, 24 мм (3)

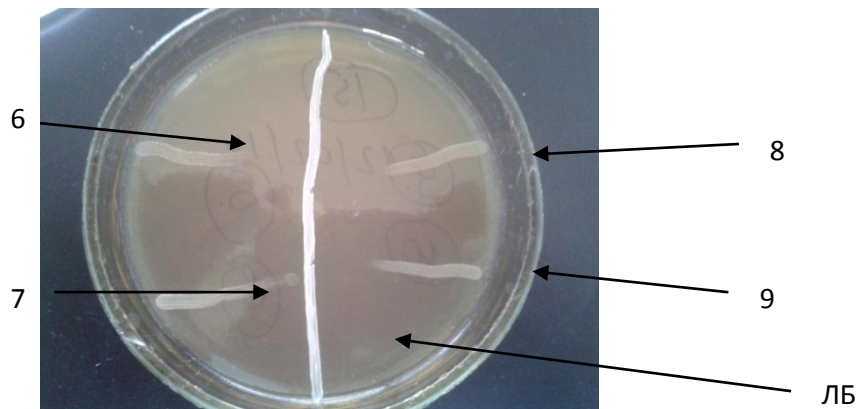


Рис. 9. Антагонізм ізолята ЛБ до *Micrococcus flavus*, 24 мм (6), *Salmonella enteritidis*, 30 мм (8), *Salmonella typhimurium*, 24 мм (9)

Отже досліджені культури лактобактерій проявляли антагоністичні властивості по відношенню до штамів *Salmonella* та *Yersinia pseudotuberculosis* (рис. 1-9). Культури ПН-1, ПН-4, ЛБ проявляли антагоністичні властивості до штамів *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Micrococcus flavus*. По відношенню до штамів *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *E.coli O157*, *Stafilococcus aureus ATCC 25923* досліджені культури лактобактерій антагонізму не проявляли. У подальших дослідженнях нами буде визначено адгезивні та кислотоутворюючі властивості культур *Lactobacillus*.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. За результатами проведених нами досліджень встановлено, що морфологічні властивості виділених ізолятів ідентичні та відповідають видовим ознакам роду *Lactobacillus*.

2. Всі досліджені культури *Lactobacillus* проявляли антагоністичні властивості до *Yersinia pseudotuberculosis* та *Salmonella enteritidis*.

3. Культури ПН-1, ПН-4, ЛБ проявляли антагоністичні властивості до *Yersinia pseudotuberculosis*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*.

4. У подальшому нами буде вивчено адгезивні і кислотоутворюючі властивості культур *Lactobacillus* та визначено найбільш перспективні штами для подальшого використання у біотехнологічних розробках.

Список використаної літератури:

1. Лебедева И. А. Кормление цыплят-бройлеров с использованием пробиотиков // Аграрный вестник Урала, 2009. – №12. – С. 63 – 64.

2. Микробиологические препараты в рационах молодняка / Ш. Альпейсов [и др.] // Птицеводство, 2009. – № 10. – С. 51 – 52.

3. Выделение и отбор бактерий рода *Lactobacillus* – основы пробиотических препаратов. Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания / И. А. Буряко [и др.] // Современное состояние и перспективы: Сб. матер. Междунар. конф. 2 – 4 июля 2004 г. – М., 2004.

4. Изучение стабильности свойств молочнокислых бактерий / В. Ганина [и др.] // Молочная промышленность, 2006. – № 10. – С. 39.

5. Герхарда Ф. Методы общей бактериологии. Т. 1 / под ред. Ф. Герхарда и др; пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – С. 60.

6. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под. ред. М. О. Биргер. – 3 изд., перер. и доп. – М.: Медицина, 1982. – С. 170 – 172.

ИЗУЧЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ / Н. А. Пустовит

*Лактобактерии являются представителями нормальной микрофлоры молока и обладают способностью сдерживать размножение условно – патогенной микрофлоры за счет выработки бактериоцинов , молочной кислоты и других биологически активных веществ. В данной статье приведены результаты изучения антагонистических свойств изолятов *Lactobacillus* выделенных из молока здоровых коров.*

Ключевые слова: лактобактерии, антагонизм, молоко, микрофлора, молочная кислота, изоляты.

STUDY ANTAGONISTIC PROPERTIES LACTOBACILLI / N. A. Pustovit

*Lactobacilli are members of the normal microflora of milk and have the ability to inhibit multiplication of pathogenic microorganisms by making bactericins, lactic acid and other biologically active substances. This article presents the results of a study of the antagonistic properties of selected isolates *Lactobacillus* from milk of healthy cows.*

Keywords: lactobacilli, antagonism, milk microflora, lactic acid isolates.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук **Н. Г.Пінчук** .

Рукопис надійшов 20.02.2014 року.