

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ТВАРИН У ПРОЦЕСІ ДОСЛІДЖЕНЬ

Гужвинська С.О., Гадзевич Д.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Фундаментальними та прикладними дослідженнями в останні роки показана визначна роль для здоров'я тварин представників корисної мікрофлори – молочнокислих бактерій та біфідобактерій. Ці групи мікроорганізмів вводять до складу пробіотиків, біологічно активних добавок і продуктів функціонального харчування. У сучасний період розширилась сфера виробництва пробіотиків на основі штамів лактобацил і біфідобактерій. Удосконалення та розробка нових препаратів на основі живих культур мікроорганізмів є одним з актуальних завдань біотехнології. Пошук штамів мікроорганізмів, що мають властивості щодо синтезу вітамінів, амінокислот, ферментів, антибіотичних речовин є визначальним при розробці пробіотичних препаратів і потребує методично правильного проведення досліджень з використанням сучасних методів [1, 2].

У зв'язку з цим, одним з поставлених для вирішення завдань було визначення біологічних властивостей молочнокислих бактерій, виділених від тварин у процесі досліджень.

При доборі мікроорганізмів до складу пробіотиків основна увага приділялась бактеріям родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, як найбільш фізіологічно-цінним компонентам індигенної мікрофлори здорового організму. Штами вилучали із молока здорових корів і шлункового тракту здорових поросят та телят.

Матеріали і методи досліджень. Об'єктами досліджень були культури мікроорганізмів родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, виділені із молока корів і шлунково-кишкового тракту тварин.

Ідентифікацію досліджуваних штамів проводили за визначником бактерій Бергі [3], а також за описами та характеристиками інших авторів [4].

Біологічні властивості штамів вивчали за наступними показниками: морфологічні та біохімічні властивості, типовість росту. Морфологію клітин і колоній окремих штамів визначали при мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом, типовість росту – шляхом висіву культур на рідкі та тверді поживні середовища, біохімічні властивості – висівом на середовище Гісса.

Результати досліджень. У результаті бактеріологічних досліджень проб ізольовано та типовано до виду 317 культур мікроорганізмів, які були віднесені до таких родів: *Lactobacillus* 127 (40,2%), *Bifidobacterium* 104 (32,8%), *Lactococcus* 42 (13,2%), *Bacillus* 11 (3,4%), *Enterococcus* 33 (10,4%) (рис.1).

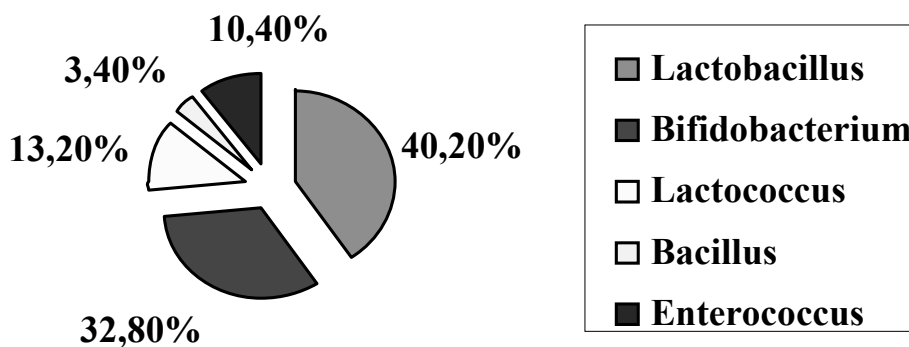


Рис. 1. Співвідношення представників різних родів пробіотичних культур, що були ізольовані від тварин у дослідженнях

При визначенні видової належності встановили, що із 127 культур роду *Lactobacillus* віднесено до таких видів: *L. plantarum* (37,2%), *L. casei* (23,6%), *L. acidophilus* (16,5%), *L. fermentum* (13,3%), *L. delbrueckii* (5,5%), *L. brevis* (3,9%) (рис.2).

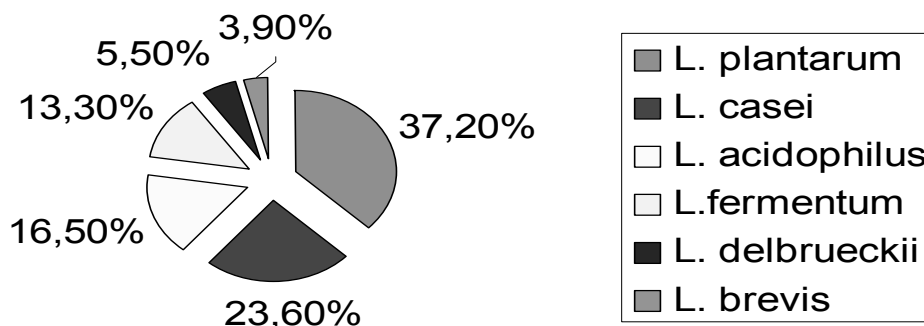


Рис. 2. Видовий склад лактобактерій, що були ізольовані в дослідженнях

Культури роду *Bifidobacterium* виділяли в 32,8% випадках. Найчастіше це були представники видів *B. adolescentis* (42,5%), *B. infantis* (18,3%), *B. bifidum* (8,7%), *B. breve* (6,7%), *B. lactentis* (10,6%), *B. longum* (13,4%) (рис. 3).

Слід зазначити, що при визначенні видового складу мікрофлори цистернального та паренхімного молока були відібрані проби молока від 57 здорових корів. У результаті проведеної роботи виділено 82 культури, в тому числі: стрептококів – 27, стафілококів – 7, ентеробактерій – 2, лактобактерій – 26 та біфідобактерій – 20. З 16 проб цистернального молока виділено всього 45 культур,

з них 11 – стрептококів, 5 – стафілококів, ентеробактерій – 2, лактобактерій – 16 і біфідобактерій – 11. Із 21 проби паренхимного молока було виділено всього 37 культур, видовий склад яких був такий: стрептококів – 16, стафілококів – 2, лактобактерій – 10 та 9 біфідобактерій. Результати досліджень наведені на рисунках 4 та 5.

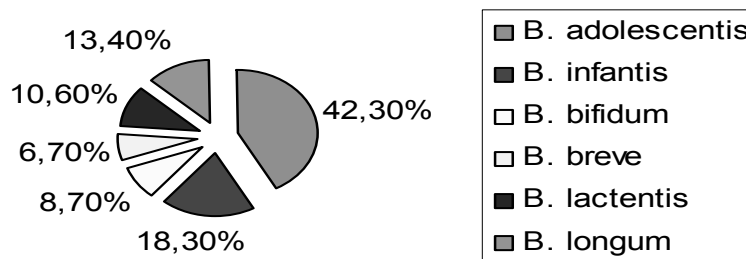


Рис. 3. Видовий склад біфідобактерій, що були ізольовані в дослідженнях

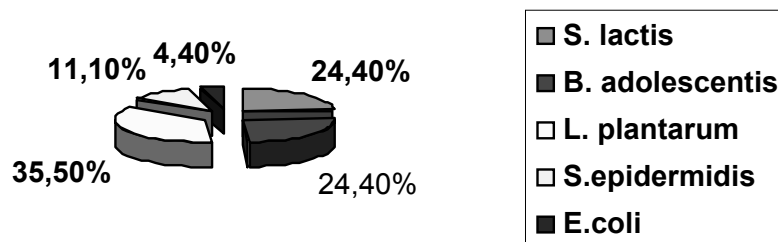


Рис. 4. Мікрофлора цистернального молока від здорових корів

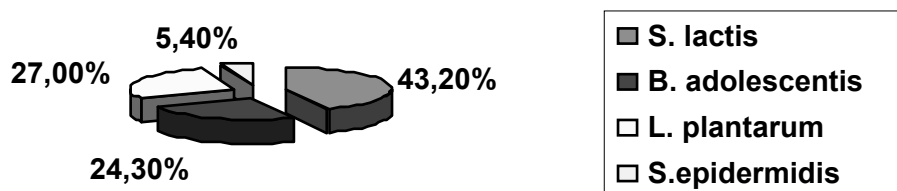


Рис. 5. Мікрофлора паренхимного молока від здорових корів

Аналіз одержаних результатів дослідження цистернального та паренхимного молока від здорових корів свідчить про те, що суттєвої різниці між ними у видовому складі мікрофлори немає. Необхідно відмітити, що ентеробактерії в цистернальному молоці виділені у 4,4 % випадків, тоді як у паренхимному молоці ентеробактерії відсутні.

На основі вивчення культурально-морфологічних і біохімічних властивостей виділених з молока бактерій, 27 культур грампозитивних стрептококів віднесено до *Streptococcus lactis*, 7 грампозитивних культур стафілококів – до *Staphylococcus epidermidis*, 1 культуру ідентифіковано як *E. coli* та 1 культуру як *Proteus vulgaris*, 26 паличковидних, грампозитивних, з відсутньою рухомістю культур були ідентифіковані як *Lactobacillus plantarum*, а 20 культур були визначені як *Bifidobacterium adolescentis*.

Зважаючи на той факт, що найважливішу роль у технології виготовлення пробіотиків відіграють лактобактерії та біфідобактерії, нами були проведені дослідження щодо відбору найбільш перспективних виробничих культур для створення пробіотичних препаратів.

На основі вивчення морфолого-культуральних і фізіологічних властивостей виділених культур було відібрано для подальших досліджень 20 штамів, які відповідали за своїми ознаками представникам роду *Bifidobacterium*. Досліджувані штами являли собою грампозитивні палички, розміром близько 0,5–1,3 x 1,5–8 мкм, варіабельні за формою та розташуванням. Зазвичай вигнуті, булавоподібні та часто розгалужені на кінцях. Нерухливі. Через 48 годин культивування клітини забарвлювалися не рівномірно. Усі досліджувані штами росли лише в анаеробних умовах. На поверхні твердого середовища МРС вони утворювали кремово-білі, опуклі, круглі, з рівним краєм колонії, 1–2 мм у діаметрі, пастоподібної консистенції. У напіврідкому середовищі досліджувані штами утворювали колонії у вигляді «комет», «гвіздків» і т.п. У рідкому середовищі без створення анаеробних умов спостерігався придонний ріст у високому стовпчику середовища, а в анаеробних умовах – рівномірний ріст по всьому об'єму середовища. Штами не мали каталазної та нітрат редуктазної активності, не утворювали газу із глюкози. У результаті проведених досліджень з виділення й добору біфідобактерій їх віднесено до виду *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactentis*, *B. longum*.

Із виділених культур було відібрано 26 штамів, які відповідали за своїми ознаками представникам роду *Lactobacillus*. Досліджувані штами являли собою грампозитивні аспорагенні палички звичайної форми. Лактобактерії вирощені на середовищі МРС-2 мали щіткоподібний ріст в середній та нижній частинах пробірки, на агаризованому середовищі МРС-4 і на агарі з гідролізованим молоком – дрібні прозорі колонії. Колонії на агаризованих середовищах мали діаметр (2–5) мм, випуклі, з цільними краями, непрозорі, непігментовані. У мазках – клітини паличковидні, звичайної форми, (0,5–1,2) x (1,0–10,0) мкм. Палички довгі, інколи зустрічалися коковидні, які були розташовані короткими ланцюгами. Вони факультативні анаероби, хемоорганотрофи, потребували складних середовищ для вирощування. Культури проявляли метаболізм бродильного типу, нітрат не відновлювали, желатин не розріджували, були каталазонегативними, цитохромів не містили. З роду лактобацил найчастіше вдавалося ізолювати бактерії видів *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*.

На основі вивчення морфолого-культуральних властивостей виділених культур було відібрано 27 штамів роду *Lactococcus*, групи грампозитивні коки. Досліджені бактерії мали клітини сферичної або овальної форми, розміром (0,5–1,2) x (0,5–1,5) мкм, у рідкому середовищі росли в парах і коротких ланцюгах, ендоспор не утворювали, були грампозитивними, нерухомими, капсул не мали. Штами були факультативними анаеробами, каталазо- та оксидазонегативними, хемоорганотрофами, мали метаболізм бродильного типу, зброджували вуглеводи з утворенням молочної кислоти, газу не утворювали. За переліченими характеристиками штами ідентифіковані та віднесені до виду *Streptococcus lactis*.

Наведені результати досліджень свідчать, що в молоці корів найбільш поширеними є наступні штами мікроорганізмів: *Streptococcus lactis* (32,9 %), *Lactobacillus plantarum* (31,7 %) та *Bifidobacterium adolescentis* (24,5 %).

Наступним етапом роботи було вивчення біологічних властивостей у 28 культур молочнокислих бактерій і 26 культур біфідобактерій, виділених від здорових поросят 1–15-добового віку, а також 40 культур молочнокислих і 20 культур біфідобактерій, виділених від поросят 30–120-добового віку. У видовому складі мікроорганізмів цих двох груп поросят виявлені деякі відмінності. Так, гетероферментативні види лактобацилл зустрічалися тільки у 1–15-добових поросят: *Lactobacillus fermentum* складала 21,4 % від усіх виділених культур, *L. brevis* – 7,15 %. У них також виділений вид *L. delbrueckii* (7,15%). У поросят обох груп виділені *L. Casei var. rhamnosus* (39,3 % у 1–15-добових і 40 % у 30–120-добових поросят), *L. plantarum* (17,75 % і 50 % відповідно), *Lactococcus lactis* (7,15 % і 10 %, відповідно).

Від 1-15- добових поросят були виділені такі види біфідобактерій: *Bifidobacterium bifidum* (46,1 %), *B. adolescentis* (23,1 %), *B. infantis* (23,1 %), *B. suis* (7,7 %). Від 30–120-добових поросят виділені *B. adolescentis* (40 %), *B. lactentis* (20 %) і *B. longum* (40 %). Таким чином, найбільш поширеними та універсальними видами для всіх вікових груп поросят виявилися *L. casei var. rhamnosus* і *B. adolescentis*. Слід відмітити, що із шлунково-кишкового тракту новонародженого теляти було виділено культуру *Bacillus subtilis*.

Отже, проведені дослідження дозволили ізолювати значний арсенал бактерій родів: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, які можуть бути використанні у подальшому для створення пробіотичних препаратів.

Висновки. У результаті бактеріологічних досліджень проб ізолювано та типовано до виду 317 культур мікроорганізмів, які були віднесені до таких родів: *Lactobacillus* 127 (40,2 %), *Bifidobacterium* 104 (32,8 %), *Lactococcus* 42 (13,2 %), *Bacillus* 11 (3,4 %), *Enterococcus* 33 (10,4 %).

Список літератури

1. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности [Текст] / Л.А. Банникова. – М. : Пищевая пром-сть, 1975. – 256 с.
2. Егоров, Н.С. Микробы антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности [Текст] / Н.С. Егоров. – М. : Высш. шк., 1965. – 211 с.
3. Определитель бактерий Берджи [Текст] / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. – М. : Мир, 1997. – Т. 1. – М. : Мир, 1997. – 426 с.
4. Полтавська, О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізолюваних з різних природних джерел [Текст] : дис. ... канд. біол. наук / О.А. Полтавська. – К., 2006. – 132 с.

STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ANIMALS IN RESEARCH

Guzvinskaya S.A., Gadzevich D.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

The article presents data on the selection, identification of lactic acid bacteria and study of their biological properties. As a result of bacteriological samples were isolated and typed to 317 species of microorganism cultures which are assigned to these genera: *Lactobacillus* 127 (40.2 %), *Bifidobacterium* 104 (32.8 %), *Lactococcus* 42 (13.2 %), *Bacillus* 11 (3.4 %), *Enterococcus* 33 (10.4 %).

УДК 619:616.98:579:636

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ХЛАМІДІЙ

Данілова І.С., Малакєєва А.Г., Болотін В.І., Стеценко В.І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Хламідіоз – одна з поширених інфекційних хвороб сільськогосподарських тварин і птиці, для якої характерні поліморфізм клінічних ознак, хронічний перебіг і соціальна небезпека. У дорослих тварин найбільш частіше вражаються статеві органи, що призводить до масових абортів у неблагополучних стадах, народження слабкого, нежиттєздатного приплоду. Крім того у хворого молодняка тварин можуть виникати артрити, кератокон'юнктивіти, діарея, риніти та бронхопневмонії [1, 2, 3].

Хламідії входять до порядку *Chlamydiales*, належать до облигатних внутрішньоклітинних паразитів. Широке розповсюдження та різноманіття клінічних форм перебігу інфекцій, що викликаються хламідіями, передбачають необхідність їх всебічного вивчення.

До останнього часу залишається маловивченим питання поширення хламідіозу серед різних видів тварин, недостатньо розроблена методика визначення ступеня тяжкості перебігу захворювання, а, отже, і проведення адекватної терапії.

Метою наших досліджень було виділення та вивчення культуральних і патогенних властивостей ізолюваних хламідій, репродукованих у системах як *in vitro*, так й *in vivo*, та проведення за допомогою ПЛР їх типування за поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ПЛР-ампліконів, а також секвенування нуклеотидної послідовності фрагменту гена *omp1*.

Матеріали та методи. У досліді використовували два ізоляти хламідій, виділені на курячих ембріонах від хворого на хламідіоз теляти («V. Olexandrivka/11»), та від кнурів-плідників («Tverdomedovel/12»).

Для вивчення культуральних властивостей використовували перещеплювану культуру клітин McSoу (клітини доброякісної пухлини, що отримані з синовіальної рідини колінного суглобу хворої на артрит людини). Культивування здійснювали стаціонарним способом у середовищі Ігла ДМЕМ із додаванням 10 % сироватки великої рогатої худоби та антибіотиків (гентаміцин 10 мг/см³ та амфотерицин 3 мг/см³) до формування суцільного моношару. Для визначення культуральних властивостей ізолятів використовували культуру клітин McSoу з посівною концентрацією клітин 150–350 тис. клітин/см³.

Для вивчення патогенних властивостей хламідій використовували 6-денні курячі ембріони, одержані з господарств, благополучних щодо інфекційних хвороб птиці. Зараження проводили в жовтковий міхур у дозі 0,4 см³ з інфекційною активністю 10⁵ ЕЛД_{50см³}.

Для виявлення тілець-включень збудника хламідіозу використовували світлову мікроскопію мазків-відбитків з жовткових міхурів інфікованих курячих ембріонів, пофарбованих за методом Стемпа. Мазки-відбитки інфікованої хламідіями культури клітин McSoу фарбували за Маккіавелло.