РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ОСНОВНИХ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАКТЕРІЙ КУРЕЙ, ВИДІЛЕНИХ В ПТАХОГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ

А. С. Шайко⁵, аспірантка

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна
19angelique14@gmail.com

Стрімкий ріст антибіотикорезистентності мікроорганізмів породив нові тенденції в тваринництві та науці: пошук альтернатив хіміотерапевтичним протимікробним препаратам та активний розвиток знань про нормальну та пробіотичну мікрофлору. У світлі активного використання пробіотиків під час вирощування птиці, гостро постає питання вивчення актуального стану нормофлори птахів в господарствах України.

*Метою роботи була ізоляція та вивчення основних біологічних властивостей лактобактерій птахів з господарств України. Авторами роботи було відібрано зразки в господарствах на території України для виділення мікроорганізмів *Lactobacillus* spp. У виділених ізолятах вивчали морфологію, культуральні, ферментативні та кислотоутворюючі властивості, а також протеолітичну та каталазну активність. Із відібраних зразків було виділено 48 грампозитивних паличкоподібних, каталазонегативних ізолятів, що належали до роду *Lactobacillaceae* spp. Під час наступного етапу досліджень було встановлено, що жоден із ізолятів не розріджував желатину, а ізоляти 1, 9, 13 та 29 мали високі кислотоутворюючі властивості, що склало 8,3% від загальної кількості виділених ізолятів.*

*В результаті вивчення ферментативних властивостей за допомогою визначника бактерій Берджі було встановлено, що ізолят 1 – це *Lactobacillus acidophilus*, ізолят 9 – *Lactobacillus plantarum*, ізолят 13 – *Lactobacillus delbrueckii*, а ізолят 29 – *Lactobacillus fermentum*. За результатами проведеної роботи було виділено 48 ізолятів *Lactobacillaceae* spp. При цьому, найвищий відсоток виділення *Lactobacillaceae* spp. був із зразків посліду – 92,8 %, найнижчий – у змивах з інвентаря – 14,2 %. З поїлок відсоток виділення лактобактерій склав 78,5 %, а зі змивів технологічного обладнання – 64,2 %. Серед 48 виділених ізолятів лише 8,3 % мали високі кислотоутворюючі властивості.*

Ключові слова: АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ, ПРОБІОТИКИ, НОРМОФЛОРА, *LACTOBACILLACEAE* spp., ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ.

THE RESULTS OF THE STUDY OF THE MAIN BIOLOGICAL PROPERTIES OF CHICKEN LACTOBACTERIA ISSUED IN POULTRY FARMS OF UKRAINE

A. S. Shaiko

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15, Heroiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine,
19angelique14@gmail.com

The rapid growth of antibiotic resistance in microorganisms has given rise to new trends in animal husbandry and science: the search for alternatives to chemotherapeutic antimicrobials and the

⁵Науковий керівник – В. О. Ушкалов, д. вет. н., професор, академік НААН

active development of knowledge about the normal and probiotic microflora. In the light of the active use of probiotics during poultry farming, the question of studying the current state of the normal flora of birds in Ukrainian farms is acute.

The aim of the work was to isolate and study the main biological properties of lactobacilli of birds from Ukrainian farms. The authors of the work selected samples from farms in Ukraine for the isolation of microorganisms *Lactobacillus spp.* Morphology, culture, enzymatic and acid-forming properties, as well as proteolytic and catalase activity were studied in the isolated bacteria. From the selected samples, 48 gram-positive rod-shaped, catalase-negative isolates belonging to the genus *Lactobacillaceae spp.* During the next phase of the study, it was found that none of the isolates diluted gelatin, and isolates 1, 9, 13 and 29 had high acid-forming properties, which amounted to 8.3% of the total number of isolated bacteria.

As a result of studying the enzymatic properties using the determinant of Bergey's Manual, it was found that isolate 1 was *Lactobacillus acidophilus*, isolate 9 was *Lactobacillus plantarum*, isolate 13 was *Lactobacillus delbrueckii*, and isolate 29 was *Lactobacillus fermentum*. According to the results of this work, 48 isolates of *Lactobacillaceae spp.* In this case, the highest percentage of *Lactobacillaceae spp.* was from samples of manure - 92.8 %, the lowest - in washes from inventory - 14.2 %. The percentage of lactobacilli from drinking bowls was 78.5 %, and from washing of technological equipment - 64.2 %. Among the 48 isolated isolates, only 8.3% had high acid-forming properties.

Keywords: ANTIBIOTIC RESISTANCE, PROBIOTICS, NORMOFLORA, *LACTOBACILLACEAE SPP*, PROBIOTIC PROPERTIES.

Питання поширення антибіотикорезистентності мікроорганізмів давно знаходяться на порядку денному у Всесвітній організації охорони здоров'я (WHO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин (OIE). Особливо гостро даний феномен постав у світлі пандемії COVID-19. Одним із ключових до пандемічних факторів стрімкого розвитку антибіотикорезистентності було безсистемне застосування протимікробних препаратів у тваринництві. Яскравим прикладом приєднання України до даної боротьби є розроблений виконавчою владою «Порядок використання протимікробних препаратів у ветеринарній медицині», покликаний визначити принципи, правила використання протимікробних препаратів у ветеринарній медицині та заходи щодо запобігання захворювання і зменшення необхідності використання протимікробних препаратів.

Наведені вище факти породжують нові тенденції в тваринництві та науці: з одного боку – це пошук альтернатив хіміотерапевтичним протимікробним препаратам, а з іншого – активний розвиток знань про нормальну та пробіотичну мікрофлору. Саме у створенні ефективних пробіотичних препаратів багато вчених вбачають можливість до зменшення застосування антибіотиків для тварин.

Так, наприклад, Ahiwe E. U. зі співавторами стверджують, що заборона на використання антибіотиків у кормах для курчат-бройлерів у деяких частинах світу, останнім часом у поєднанні зі зростанням споживчого попиту на продукцію з птиці без антибіотиків, підвищило інтерес дослідників і виробників птахівництва до визначення відповідних альтернатив таким антибіотикам. Однією з таких альтернатив автори розглядають дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (Ahiwe et al., 2021).

Faisal Ferdous зі співавторами в роботі із вивчення пробіотиків та фітобіотиків як альтернативи стимуляторам росту, приходять до висновку, що біологічні добавки мають значний позитивний вплив на продуктивність росту, гематологічні параметри та мікробне навантаження на кишечник у курчат-бройлерів, з яких пробіотики проявляють найкращі ефекти. Доповнення пробіотиків у кормах може бути одним із найкращих кандидатів як альтернатива антибіотикам для стимулювання росту і безпечного вирощування бройлерів (Ferdous et al., 2019).

Вітчизняні вчені (Kotsiumbas et al., 2013) зазначають, що сьогодні, з метою підвищення приростів тварин і для боротьби з патогенними мікроорганізмами, як альтернативу антибіотикам пропонуються: кормові ферменти, продукти “конкурентного виключення”, пробіотики, пребіотики, органічні кислоти (підкислювачі) та фітогенні речовини.

У світлі активного розвитку технологій птахівництва з використанням пробіотиків, постає питання про сучасний стан нормофлори птахів та її біологічних властивостей.

Метою роботи була ізоляція та вивчення основних біологічних властивостей лактобактерій птахів з господарств України.

Матеріали і методи. Відбір зразків для виділення мікроорганізмів *Lactobacillus spp.* проводили в птахогосподарствах на території Київської, Чернігівської, Черкаської, Херсонської, Одеської, Харківської та Волинської областей. Зразки для дослідження відбирали в приміщеннях пташників, при цьому відбирали зразки посліду курей, змиви з поїлок, технологічного обладнання та інвентарю. Всього було відібрано 70 зразків (табл. 1).

Таблиця 1

Локація та кількість відібраних зразків

Області	Місце відбору зразків				Кількість відібраних зразків
	Послід	Змиви з поїлок	Змиви з технологічного обладнання	Змиви з інвентарю	
Волинська	4	2	2	2	10
Київська	4	2	2	2	10
Одеська	4	2	2	2	10
Харківська	4	2	2	2	10
Херсонська	4	2	2	2	10
Черкаська	4	2	2	2	10
Чернігівська	4	2	2	2	10

Виділення мікроорганізмів роду *Lactobacillaceae spp.* проводили шляхом культивування за температури 37 °C протягом 18-24 годин в бульйоні та на агарі MRS. Морфологію виділених мікроорганізмів вивчали після виготовлення та фарбування мазків за Грамом. Кислотоутворення вивчали культивуючи ізоляти за температури 37 °C протягом 18-24 годин на агарі з додаванням карбонату кальцію. Здатність до розрідження желатини вивчали культивуванням за температури 37 °C протягом 18-24 годин в середовищі з додаванням желатину. Ферментативні властивості ізолятів вивчали шляхом їх культивування за температури 37 °C протягом 18-24 годин в рідкому індикаторному середовищі з додаванням різних цукрів, а саме: арабінози, целобіози, галактози, лактози, ксилози, мальтози, маніту, маннози, мелізітози, мелібіози, рафінози, рібози, саліцину, сахарози та сорбіту.

Оцінку інтенсивності ферментації проводили візуально за системою чотирьох хрестів. Каталазну активність вивчали за загальноприйнятою методикою з перекисом водню. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за загально прийнятими методиками.

Результати й обговорення. В результаті проведеної роботи було виділено 48 грампозитивних паличкоподібних, каталазонегативних ізолятів, що належали до роду *Lactobacillaceae spp.* При цьому, найвищий відсоток виділення лактобактерій був із посліду – 92,8 %, в змивах з поїлок відсоток виділення складав 78,5 %, в змивах з технологічного обладнання – 64,2 %. Найнижчий відсоток виділення лактобактерій був у змивах з інвентаря – 14,2 % (табл. 2).

Результати виділення *Lactobacillaceae* spp. в досліджуваних зразках

Області	Місце відбору зразків та кількість ізольованих лактобактерій			
	Послід	Змиви з поїлок	Змиви з технологічного обладнання	Змиви з інвентаря
Волинська	4	2	1	0
Київська	4	1	2	0
Одеська	4	1	0	1
Харківська	3	2	1	0
Херсонська	4	1	2	0
Черкаська	4	2	1	0
Чернігівська	3	2	2	1
Всього виділено ізолятів, шт	26	11	9	2
Всього відібрано зразків, шт	28	14	14	14
Відсоток виділення лактобактерій зі зразків, %	92,8	78,5	64,2	14,2

У подальшому отримані ізоляти було перевірено на здатність розріджувати желатину та кислотоутворюючі властивості на агарі з карбонатом кальцію (рис.). Жоден із ізолятів не розріджував желатину.

Рис. Вивчення кислотоутворюючих властивостей на агарі з карбонатом кальцію.

Ізолятами, що мали високі кислотоутворюючі властивості, були ізоляти 1, 9, 13 та 29, що склало 8,3 % від загальної кількості виділених ізолятів. Наступним етапом було проведення ідентифікації вище згаданих ізолятів з визначенням виду. Для цього було досліджено їх ферментативні властивості (табл. 3).

Ізолят 1 ферментував з утворенням кислоти без газу целобіозу, галактозу, лактозу, мальтозу, маннозу, мелібіозу, рафінозу, саліцин, сахарозу та трегалозу. При цьому не ферментував арабінозу, ксилозу, маніт, мелізітозу, рібозу, сорбіт та ескулін.

Ізолят 9 ферментував з утворенням кислоти без газу арабінозу, целобіозу, ксилозу, маніт, мелізітозу, мелібіозу, рафінозу, рібозу, сахарозу, сорбіт та ескулін. Ферментації не піддавалися галактоза, лактоза, мальтоза, манноза, саліцин та трегалоза.

Результати вивчення ферментативних властивостей

Цукри	Ізолят 1	Ізолят 9	Ізолят 13	Ізолят 29
Арабіноза	-	++	-	++
Целобіоза	++++	++++	-	++
Галактоза	++++	-	-	++++
Лактоза	++++	-	-	-
Ксилоза	-	++	-	++
Мальтоза	++++	-	++	++++
Маніт	-	++++	-	-
Манноза	++++	-	++++	+
Мелізітоза	-	++++	-	-
Мелібіоза	++	++++	-	++++
Раффіноза	++	++++	-	++++
Рібоза	-	++++	-	++++
Саліцин	++++	-	-	-
Сахароза	++++	++++	++++	++++
Сорбіт	-	++++	-	-
Трегалоза	++	-	++	++
Ескулін	-	+	-	-

Ізолят 13 ферментував з утворенням кислоти без газу мальтозу, маннозу, сахарозу та трегалозу. При цьому не ферментував арабінозу, целобіозу, галактозу, лактозу, ксилозу, маніт, мелізітозу, мелібіозу, рафінозу, рібозу, саліцин, сорбіт та ескулін.

Ізолят 29 ферментував з утворенням кислоти без газу арабінозу, целобіозу, галактозу, ксилозу, мальтозу, маннозу, мелібіозу, рафінозу, рібозу, сахарозу та трегалозу. Не ферментував лактозу, маніт, мелізітозу, саліцин, сорбіт та ескулін.

У результаті вивчення морфологічних, культуральних та ферментативних властивостей, а також визначення протеолітичної і каталазної активності, за допомогою визначника бактерій Берджі було встановлено, що ізолят 1 – це *Lactobacillus acidophilus*, ізолят 9 – *Lactobacillus plantarum*, ізолят 13 – *Lactobacillus delbrueckii*, а ізолят 29 – *Lactobacillus fermentum*.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було виділено циркулюючі ізоляти лактобактерій, вивчено їх основні біологічні властивості та проведено їх типізацію.

В И С Н О В К И

1. В результаті проведеної роботи було виділено 48 ізолятів *Lactobacillaceae spp.*
2. Найвищий відсоток виділення *Lactobacillaceae spp.* був із зразків посліду – 92,8 %, найнижчий – у змивах з інвентаря – 14,2 %. З поїлок відсоток виділення лактобактерій склав 78,5 %, а зі змивів технологічного обладнання – 64,2 %.
3. Серед 48 виділених ізолятів лише 8,3 % мали високі кислотоутворюючі властивості.
4. Чотири ізоляти було типізовано до виду: ізолят 1 – *Lactobacillus acidophilus*, ізолят 9 – *Lactobacillus plantarum*, ізолят 13 – *Lactobacillus delbrueckii*, а ізолят 29 – *Lactobacillus fermentum*.

Перспективи досліджень. Перспективним вбачається подальше вивчення індигенної мікрофлори, що циркулює в господарствах України. Необхідним є вивчення біологічних властивостей (в тому числі – пробіотичних) ізолятів 1, 9, 13 та 29.

References

Ahiwe, E.U., Tedeschi, Dos Santos, T.T., Graham, H., Iji, P.A. (2021). Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens? : a review. *The J. Appl. Poult. Res. Sep*; 30(3).

Ferdous, M.F, Arefin, M.S, Rahman, M.M, Ripon, M.M.R., Rashid, M.H., Sultana, M.R., et al. (2019). Beneficial effects of probiotic and phytobiotic as growth promoter alternative to antibiotic for safe broiler production. *J. Adv. Vet. Anim. Res. Sep*; 6(3):409–15.

Kotsiumbas, I.Ya., Hunchak, V.M., Stetsko, T.I. (2013). Problemy vykorystannia antymikrobykh preparativ dlia stymuliuvannia rostu produktyvnykh tvaryn ta alternatyvy yikh zastosuvanniu. *Naukovo-tekhnichnyi biuleten Instytutu biolohii tvaryn i Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok*. 14(3-4):381-9. [In Ukrainian].