

УДК 636.087.8:619: 579.864

## ВИДІЛЕННЯ ІЗ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ КРОЛІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

Ю. М. ПОХИЛЬКО, аспірант\*

Н. О. КРАВЧЕНКО, кандидат ветеринарних наук

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва  
НААН

**Виділено зі шлунково-кишкового тракту кролів 250 штамів молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*, які є перспективними для отримання пробіотичних препаратів.**

**Вступ.** На початок 2015 р. поголів'я кролів в Україні склало 5,14 млн: сільгосп-підприємства вирощували 129,8 тис. голів, приватні господарства – 5,01 млн голів. Динаміка поголів'я за останні п'ять років була позитивною внаслідок розведення кролів дрібними фермерами та населенням [1].

Проте залишається проблема смертності молодяку кролів від шлунково-кишкових захворювань, отже, необхідно розробляти ефективні засоби її вирішення [2]. Результатом постійного вдосконалення та пошуку нових способів захисту тварин від бактеріальних захворювань є перехід від широкого застосування антибіотиків до інтенсивного впровадження у ветеринарну медицину пробіотиків [3].

Пробіотичні препарати використовують з метою профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій тварин, корекції кишкового біоценозу після анти-

біотикотерапії та для стимулювання неспецифічного імунітету [3].

Пробіотики, які сьогодні застосовуються для усунення проблем шлунково-кишкового тракту (ШКТ) кролів є універсальними й рекомендуються для різних видів тварин, у т. ч. кролів.

Однак, враховуючи особливості системи травлення кролів, що будь-яке порушення в її роботі може бути небезпечним не тільки для здоров'я, але й для життя тварин, актуальним постає питання створення пробіотичного препарату на основі біологічно активних представників нормобіоценозу ШКТ саме цих тварин [2].

Перспективною групою мікроорганізмів для створення пробіотичного препарату для кролів є бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус «GRAS». Слід також зазначити, що чисельність молочнокислих бактерій (МКБ) у шлунково-кишковому тракті кролів перевищує чисельність

\* Науковий керівник – кандидат ветеринарних наук Н.О. Кравченко

біфідобактерій [4], відповідно їх функціональна роль більш значуща.

Метою роботи є виділення зі ШКТ кролів бактерії роду *Lactobacillus* для подальшого створення пробіотичних препаратів.

#### Матеріали та методи досліджень.

МКБ виділяли шляхом дослідження біологічної проби посліду, хімусу, вмісту та слизової оболонки сліпої кишки кролів. З тваринами поводились згідно із загальними етичними вимогами до використання хребетних тварин у медичних і біологічних експериментах [5].

З біологічних зразків готували суспензію з розрахунку 1г на 9 см<sup>3</sup> фізіологічного розчину та висівали на стерильне знежирене молоко [6]. Для виділення термофільних бактерій роду *Lactobacillus* зразки тричі пасажували за температури 37 ± 2 °С. Для одержання чистих культур МКБ, використовували селективне середовище капустяний агар з крейдою [6], для подальшого накопичення бактеріальної маси – на середовищі de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). Ідентифікацію досліджуваних штамів проводили за [7].

Кількість кислоти, утвореної досліджуваними бактеріями, визначали титруванням. МКБ культивували упродовж 14 діб на стерильному знежиреному молоці, після чого культуральну рідину об'ємом 5 см<sup>3</sup> з додаванням спиртового розчину фенолфталеїну титрували 0,1 Н розчином NaOH до утворення стійкого забарвлення малинового кольору. Кислотність виражали в градусах Тернера (°Т). 1°Т відповідає 1 мл розчину NaOH, який витратили на титрування 100 мл дослідної проби. 1°Т = 0,009 г кислоти [4].

**Результати досліджень та їх обговорення.** В період з 2014-2016 рр. нами було виділено та досліджено 250 ізолятів МКБ з 50 біологічних зразків, наданих приватними господарствами після забою тварин.

За морфологічними ознаками досліджувані бактерії були паличкоподібні,

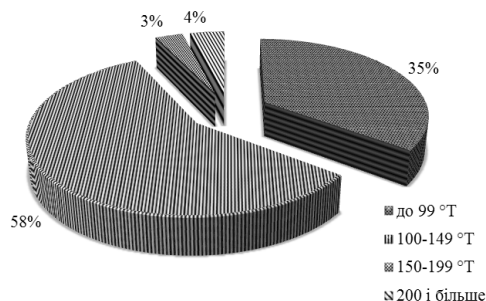
нерухомі, грампозитивні, різної товщини та довжини, що не утворювали спор, клітини розташовувались окремо або ланцюжками. Виділені ізоляти не виявляли каталазної активності.

В агаризованому середовищі MRS досліджувані бактерії утворювали колонії білого кольору 1,0-2,0 мм у діаметрі у вигляді «човників» або дисків. На рідких живильних середовищах вони росли у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні, були факультативними анаеробами.

У процесі дослідження, встановлено, що температурний діапазон росту бактерій складав від +15 °С до +45 °С, оптимальна температура для їх росту складала (37±2) °С.

За фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками досліджувані ізоляти були попередньо віднесено до бактерій роду *Lactobacillus*.

Наступним етапом досліджень було встановлення граничної кислотоутворюючої здатності ізолятів (див. рис.). Під час дослідження МКБ утворювали однорідний щільний згусток з відокремленням сироватки, без видимих ознак пептонізації. Значення граничної кислотності для 145 ізолятів, що склало 58 % від загальної кількості бактерій, не перевищувало 99°Т. Разом з тим, 10 ізолятів МКБ виявляли кислотоутворюючу активність, вищу за



**Рис. Граничне кислотоутворення бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового-тракту кролів (n=3)**



Біологічні властивості роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів

Назва ізоляту	Морфологія клітин	Спорутворення	Рухливість	Желагіназна активність	Каталазна активність	Нітрагредуктаза	Ріст за температури		Кислотоутворення, °Т	
							20 °С	45 °С	тигр.	гранич.
L-4/1	тонкі короткі** палички в ланцюжках	-	-	-	-	-	-	+	240	300
L-5/4	тонкі короткі** палички або закручені в легку спіраль	-	-	-	-	-	+	-	200	280
L-13/2	тонкі, дуже довгі* палички	-	-	-	-	-	-	+	290	350
L-16/1	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	+	-	220	260
L-16/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	+	-	250	280
L-17/2	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	+	-	180	240
L-17/3	тонкі короткі** палички, поодинокі або парами, чи в коротких ланцюжках	-	-	-	-	-	+	-	210	270
L-31/2	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	-	-	-	-	-	-	+	250	310
L-39/2	довгі* грампозитивні поодинокі палички	-	-	-	-	-	-	+	200	240
L-49/1	зернисті довгі* палички поодинокі і в ланцюжках	-	-	-	-	-	-	+	130	200

Примітка: \*довжина клітини більше 7 мкм; \*\*довжина клітини менше 5 мкм;  
+ - позитивний результат; - - негативний результат.

200 °Т, що становило 4 % від загальної кількості досліджуваних бактерій.

Відомо, що активність кислотоутворення є одним із суттєвих показників придатності культур МКБ для створення пробіотичних препаратів, оскільки їх антагоністична активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, обумовлена в

першу чергу дією органічних кислот, що знижують рН середовища. Також з літературних джерел відомо, що середовище шлунку кролів є кислішим ніж у більшості тварин та в людини [2]. Тому первинний відбір ізолятів, виділених зі ШКТ кролів, проводили за граничним значенням кислотоутворення – кількість кислоти утвореної

МКБ, культивованими упродовж 14 діб на стерильному знежиреному молоці.

Для подальшої роботи відбирались ізоляти, що виявляли кислотоутворюючу активність 200 °Т і більше.

За даним критерієм, нами обрано 10 ізолятів МКБ: L-4/1, L-5/4, L-13/2, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3, L-31/2, L-39/2, L-49/1 (табл.).

## Висновки

Зі шлунково-кишкового тракту кролів виділено та ідентифіковано до роду *Lactobacillus* 250 ізолятів молочнокислих бактерій.

Десять ізолятів (табл.) з найбільшою кислотоутворюючою активністю відібрано для подальших досліджень.

## Література

1. Продовольча та сільськогосподарська організація ООН [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.fao.org/home/en/>
2. Справочник кролиководы / Под. ред. П. С. Заболотского. – Ростов: Феникс, 2004. – 256 с.
3. Акименко Л. І. Пробиотики у ветеринарній медицині // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 5. – С. 37–38.
4. Похилько, Ю. М., Кравченко Н. О. Склад мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту молодняку кролів залежно від раціону // Науково-технічний бюлетень. – 2016. – 17(1). – С. 141–146.
5. Біоетика медико-біологічних експериментів. Моральні принципи проведення експериментів на тваринах [Електронний ресурс] / Режим доступу: [http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/deontologi/lectures\\_stud/uk/med/biol/ptn/основи%20біоетики%20і%20біобезпеки/2/2%20біоетика%20медико-біологічних%20експериментів.htm](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/deontologi/lectures_stud/uk/med/biol/ptn/основи%20біоетики%20і%20біобезпеки/2/2%20біоетика%20медико-біологічних%20експериментів.htm)
6. Квасников, Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 390 с.
7. Краткий определитель бактерий Берги / Под редакцией Дж. Хоута – М.: Мир, 1980. – 496 с.

## Література

1. Food and Agriculture Organization. Available at: <http://www.fao.org/home/en/>
2. Zabolotskii, P. S. ed. (2004). Reference breeder. Rostov: Feniks, 256 (in Russia).
3. Akimenko, L. I. (2005) Probiotics in veterinary medicine. Veterinary Medicine of Ukraine, 5, 37-38.
4. Pokhilko, Yu. M., Kravchenko, N. O. (2016). Composition of microbiota of the gastrointestinal tract of rabbits depending on ration. Scientific and Technical Bulletin, 17 (1), 141 - 146.
5. Bioethics biomedical experiments. Moral principle experiments on animals. Available at: [http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/deontologi/lectures\\_stud/uk/med/biol/ptn/основи%20біоетики%20і%20біобезпеки/2/2%20біоетика%20медико-біологічних%20експериментів.htm](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/deontologi/lectures_stud/uk/med/biol/ptn/основи%20біоетики%20і%20біобезпеки/2/2%20біоетика%20медико-біологічних%20експериментів.htm)
6. Kvasnikov, E. I., Nesterenko, O. A (1975). Lactic acid bacteria and their utilization. Moscow: Nauka, 390 (in Russia).
7. Khou, J. ed. (1980). Short Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Moscow: Mir, 496 (in Russia).

## SUMMARY

*Yu. Pokhylko, N. Kravchenko. Isolation from the digestive system of rabbits lactic acid bacteria, promising for the development probiotic preparations // Biological Resources and Nature Management. – 2016. – 8, №5–6. – P.63–66.*

*Obtained from the gastrointestinal tract of rabbits 250 strains of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*, that are promising for probiotics.*

## АННОТАЦІЯ

*Ю. Н. Похилько, Н. А. Кравченко. Выделение из пищеварительной системы кроликов молочнокислых бактерий, перспективных для создания пробиотических препаратов // Биоресурсы и природопользование. – 2016. – 8, №5–6. – С.63–66.*

*Выделены из желудочно-кишечного тракта кроликов 250 штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, которые являются перспективными для получения пробиотических препаратов.*