

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет ветеринарної медицини  
Кафедра мікробіології, фармакології та епізоотології

Кваліфікаційна робота  
на правах рукопису

Клішевич Валентин Ігорович

УДК: 619:636.52/58.087

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

**Мікробіологічна характеристика пробіотичного препарату  
«Імунобактерин Д»**

**Microbiological Characteristics of Probiotic Preparation  
«Immunobacterin D»**

211 «Ветеринарна медицина»

Подається на здобуття освітнього ступеня «Магістр»

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень.  
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на  
відповідне джерело.

---

Клішевич В.І.

Керівник роботи  
Солодка Л.О.  
к. біол.н., доцент

Житомир – 2021

## АНОТАЦІЯ

Клішевич В.І. Мікробіологічна характеристика пробіотичного препарату «Імунобактерин Д» – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 211 – ветеринарна медицина. – Поліський національний університет, Житомир, 2021.

Зміст анотації. Перевірка якості пробіотичних препаратів є актуальним питанням. Представлено результати вивчення кількісних та якісних показників пробіотика «Імунобактерин-Д» (Україна). Запропоновано схему для швидкої ідентифікації його бацилярної складової (види *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis*).

Ключові слова: пробіотики, бактерійний препарат, бацили, культуральні ознаки колоній, морфологічні та біохімічні ознаки ізолятів.

## SUMMARY

Klishevich V.I. – Microbiological Characteristics of Probiotic Preparation «Immunobacterin D» – Manuscript qualification work.

Qualification work for the master's degree in specialty 211 – veterinary medicine. – Poleski National University, Zhytomyr, 2021.

Contents of the abstract. The question of verification of probiotic's quality is relevant. The results of microbiological researches of quantitative and qualitative characteristics of «Imunobacterin-D» (Ukraine) are presented. Scheme for effective identification are proposed (sp. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*).

Key words: probiotics, bacterial preparation, bacillus, cultural features of colonies, morphological and biochemical signs of isolates.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Історія відкриття мікробів-пробіотиків та виробництва пробіотичних препаратів.....	7
1.2 Підходи до оцінки якості бацилярних біопрепаратів та питання ідентифікації їх мікробної складової .....	10
Висновки до розділу 1.....	16
РОЗДІЛ 2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	17
2.1 Матеріали і методи досліджень .....	17
2.2 Характеристика місця виконання роботи.....	21
2.3 Результати власних досліджень.....	23
Висновки до розділу 2.....	30
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	31
Висновки до розділу 3.....	35
ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ .....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	37
ДОДАТКИ.....	42

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ,  
СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

АЧ – агар Чапека

КУО/г – колонієутворюючі одиниці, кількість зародків бацил ( вегетативних клітин чи ендоспор) в 1 г зразка.

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

pH – кислотність розчину (в роботі – кислотність поживних середовищ для культивування мікроорганізмів).

СА – сольовий агар

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ФВМ – факультет ветеринарної медицини

## ВСТУП

**Актуальність теми дослідження.** Терміни «пробіозис» (вигідне співіснування тварин з певними групами їх автохтонних мікробів) та «пробіотики» (живі мікроорганізми, здатні покращати роботу мікробної асоціації кишечника) використовують з 70-х років 20 ст. В гуманній медицині більше 50-ти років користуються препаратами з мікроорганізмів родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та непатогенними штамми виду *E. coli*. В сучасній лікарській практиці застосовують не лише монопрепарати на основі одного роду мікробів («Лактобактерин», «Біфідумбактерин», «Біфілонг», «Колібактерин», «Біофлор» тощо), але й суміші бактерій («Меділакта», «Ріофлора», «Полібактерин» тощо).

Мікроби, які використовують в якості лікарської «добавки», мають бути непатогенними, здатними до перенесення високих концентрацій HCl та жовчі, до колонізації тканин кишечника та швидкого розмноження в ньому, до виділення ряду біологічно активних речовин. Виявилось, що метаболіти лакто-, біфідобактерій та кишкової палички нездатні впливати на певні види факультативно-патогенних бактерій та грибів, і це спричинило пошук нових видів мікробів для створення пробіотиків. Такі мікроорганізми було знайдено серед представників родів *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, генетично здатних до утворення ендоспор. Така властивість дозволяє їм зберігати життєздатність і активність під час ліофілізації при виготовленні різних лікарських форм, легко переживати несприятливі умови верхніх відділів шлунково-кишкового тракту.

Використання бацилярних пробіотиків в тваринництві вже розпочато, але можливий спектр дії біопрепаратів, варіанти і методики їх використання потребують додаткових досліджень.

**Мета і завдання роботи.** Перевірка якості вітчизняних препаратів пробіотиків шляхом ідентифікації в них паличкоподібних спороутворюючих бактерій видів *Bac. subtilis* та *Bac. licheniformis*.

**Предмет та об'єкт дослідження.** Предметом дослідження є різні форми

пробіотиків виробництва України, об'єктом – бактерійна основа препаратів, а саме паличкоподібні спороутворюючі бактерії видів *Bac. subtilis* та *Bac. licheniformis*.

**Методи дослідження.** В роботі використовували бактеріологічні дослідження (вирощування накопичувальних та чистих культур); статистичні дослідження (обробка результатів кількісних висівів); мікроскопічні дослідження (фарбування бактерійного матеріалу з накопичувальних та чистих лабораторних культур, підтвердження належності мікробів ізолятів до певної морфологічної групи та роду); біохімічні дослідження (видова ідентифікація).

**Перелік публікацій автора.** 1. Клішевич В.І., Солодка Л.О. Нормальна мікробіота статевих шляхів корів. *Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії: матеріали 22-ї наук.-практ. конф. магістрів та бакалаврів (22 січня 2021 р.)*. Житомир, 2021. Вип.№12. С. 173-175.

2. Клішевич В.І. Характеристика пробіотиків на основі спороутворюючих бактерій. *Наукові здобутки студентської молоді у ветеринарії: матеріали 22-ї наук.-практ. конф. магістрів та бакалаврів (22 січня 2021 р.)*. Житомир, 2021. Вип.№12. С. 170-173.

3. Солодка Л.О., Рибачук Ж.В., Клішевич В.І. Ідентифікація мікроорганізмів певних видів в бацилярних пробіотичних препаратах. *Збірник тез міжн. наук.-практ. конф. «Біобезпека, захист та благополуччя тварин» (21 травня 2021 р.)*. Київ, 2021. С.27-31.

**Практичне значення отриманих результатів.** Видова ідентифікація бацил в препаратах пробіотиків надасть інформацію щодо якості біологічно активних, імуностимулюючих вітчизняних препаратів.

**Структура та обсяг роботи.** Дипломна робота включає всі розділи, зазначені в «Методичних порадах до написання кваліфікаційної роботи для студентів спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». Написана на 43 сторінках, містить 7 таблиць, 18 рисунків, 46 посилань на бібліографічні джерела та електронні ресурси.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Історія відкриття мікробів-пробіотиків та виробництва пробіотичних препаратів

Концепція про те, що корисні бактерії існують в шлунково-кишковому тракті або мають регулярно надходити в дану систему, народилась на початку 20 ст. [1, 2]. В 1900 р. Тис'є виділив з кишечника новонародженого біфідумбактерії (*Bacillus bifidus communis*), в 1905 р. болгарський мікробіолог Григоров встановив, що причиною ферментації йогурту є життєдіяльність молочнокислої бактерії (*Lactobacillus delbrueckii*). В той самий час питанням зв'язку між довголіттям та вживанням молочнокислих продуктів зацікавився І.І.Мечников. В 1908 р. він надрукував статтю «Декілька слів про кисле молоко», в якій зазначив, що кишкова аутоінтоксикація виникає внаслідок виділення певними резидентними бактеріями значних кількостей похідних фенолу, індолу та аміаку. Ним було запропоновано витіснити патогенні мікроби з товстого кишечника лактобацилами або бактеріями молочної кислоти (БМК). Сам Мечников з початку 20 ст. і до своєї смерті в 2016 р. постійно вживав кисломолочні продукти, а також – чисті культури болгарської палички.

В 1917 р. німець Альфред Ніссле ізолював з фекалій непатогенний штам кишкової палички, який припиняв симптоми ентероколіту при шигелльозі. Дана культура була першим прикладом використання корисного мікроорганізму, який не належав до морфологічної підгрупи молочнокислих бактерій.

В другій половині 20 ст. (1953 – 2000 рр.) до трактування, пояснення та розширення змісту терміну «пробіотики» мали відношення вчені різних країн та спеціальностей [3]. Загалом, ідею щодо багатоваріантної стимуляції та позитивного впливу на організм хазяїна при введенні пробіотиків було запропоновано і сформульовано Коллатом (бактеріолог, Німеччина), Ванбелле (біохімік-тваринник, Франція), Ліллі та Стілвеллом (ветеринари,

США), Фуллером та Гібсоном (мікробіологи, Велика Британія), Роберфройдом (лікар, Бельгія), Рейдом (мікробіолог та імунолог, Канада), Шендеровим (мікробіолог, Росія). Саме тому фахівці гуманної медицині більш, ніж півстоліття, користуються пробіотичними препаратами з різними мікроорганізмами:

1. лактобактерії («Лактобактерин», «Трілак», «Ацілакт», «Ацидобак», «Гастрофарм»);
2. біфідумбактерії («Біфідумбактерин», «Біфілонг», «Біфідум Баг», «Біовестин»)
3. кишкова паличка («Колібактерин», «Біофлор»).

Мікроби, які використовують в якості лікарської «добавки», мають бути непатогенними, витримувати високі концентрації HCl та жовчі, здатними колонізувати тканини і швидко розмножуватись в них, виділяти ряд біологічно активних речовин для нормалізації мікробіому кишечника [4]. Зазначені бактеріальні культури можуть бути як монопрепаратами (на основі одного роду мікробів), так і композиціями («Меділакта», «Ріофлора», «Полібактерин» тощо).

З часом виникла ідея, що перспективні мікроби для створення нових пробіотиків слід шукати не лише серед збудників бродінь, але й серед представників інших родин. Виявилось, що такими можуть бути бактерії родів *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, генетично здатні до утворення ендоспор. Завдяки цьому дані бацили зберігають життєздатність і активність під час ліофілізації при виготовленні різних лікарських форм, легко переносять несприятливі умови, наявні у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту (ШКТ) [5-7]. Їх екзометаболітами є протеази, пектинази, амілази, ліпази, і дані ферменти можуть руйнувати тромби та певні види алергенів, зменшувати розміри холестеринових міцел. Утворені бацилами пептиди з антибіотичними властивостями мають однотипну структуру, але різні кінцеві функціональні групи, що призводить



до формування сповільненої резистентності до них у патогенів різних видів та морфологічних груп [8-11].

Всередині зазначених родів (наприклад, роду *Bacillus*) разом із непатогенними існують і токсигенні види, що дещо обмежує широке використання представників роду і вимагає суворої перевірки перспективних виробничих штамів щодо імовірності виробництва ними токсинів та ферментів патогенності. Належність бацил до транзитних (по відношенню до мікробної асоціації кишечника) мікроорганізмів виявилась не негативною, а позитивною рисою. Саме ця характеристика дозволила створити біопрепарати, які певний час здатні діяти на мікробом тих чи інших систем, завдяки синтезованим метаболітам «видаляти» небажані види, але згодом – безумовно видаляться. Так, застосування бацилярних пробіотиків призводить до того, що вже на 3 добу від початку їх вживання кількість патогенних стафілококів та кишкових паличок суттєво зменшується.

Штами бацил видів *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. toyoi*, *B. mesentericus*, *B. polymyxa*, містяться в таких пробіотиках як «Біоспорин», «Бактисубтіл», «БіоПлюс», «Ендоспорин», «Ентерожерміна», «Споробактерін», «Флонівін БС» тощо [6]. В кінці 20 ст. такі препарати виробляють спеціалізовані підприємства в західній та східній Європі (Данія, Італія, Франція, Польща, Словенія, Чорногорія, Росія, Україна, Швеція), азійських країнах (Китай, Японія, Південна Корея, В'єтнам), США тощо (табл.1).

Пробіотики на основі мікробів роду *Bacillus* після ліофілізації є бактеріальною біомасою, в якій суттєво переважають ендоспори. Після потрапляння в шлунок оболонки ендоспор починають розрихлюватись. Це сприяє їх прискореному переходу у вегетативні клітини вже на початку кишечника. За використання спеціальних ендоскопів було встановлено, що в таких умовах із початкових  $10^9 - 10^8$  клітин/см<sup>3</sup> життєздатними залишаються в 100-1000 разів менше клітин, але й  $10^6 - 10^7$  бацил/см<sup>3</sup> спричинюють стійкі позитивні зрушення в напрямку оздоровлення мікробної асоціації ШКТ.

Таблиця 1. Характеристика європейських бацилярних пробіотиків

Вид мікроорганізму	Назва препарату	Країна-виробник	Форми мікробів в препараті	Кількість клітин, КУО/г
<i>Bac.subtilis</i>	Субалін Форте	Україна	клітини та спори	$2 \cdot 10^9$
<i>Bac.subtilis</i> 44-p	Vetoprof БПС-44	Україна	клітини	$5 \cdot 10^9$
<i>Bac.subtilis</i> 534	Споробактерін	Росія	клітини	$1 \cdot 10^9$
<i>Bac.subtilis</i> (шт. 39 та 51)	Ендоспорин	Україна	клітини	по $4,5 \cdot 10^{11}$ кожного штаму
<i>Bac.subtilis</i> 945 (B-5225)	Моноспорин	Росія	спори	$1 \cdot 10^8$
<i>Bac.cereus</i> IP5832	Бактисубтіл	Франція	спори	$1 \cdot 10^9$
<i>Bac.cereus</i> IP5832	Флонівін БС	Чорногорія	спори	$1 \cdot 10^9$
<i>Bac.clausii</i> UBBC-07	Ентерожерміна	Італія	спори	$2-4 \cdot 10^9$
<i>Bac. subtilis</i> (різні штами)	Ветом 1, Ветом-3	Росія	спори	$1 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^9$
<i>Bac.licheniformis</i>	Ветом-2			
<i>Bac.subtilis</i> + <i>Bac.licheniformis</i>	Ветом-4			
<i>Bac.subtilis</i> 5750 + <i>Bac.licheniformis</i> 5749	Біо Плюс	Німеччина	спори	$1,6 \cdot 10^9$
<i>Bac.subtilis</i> 5007 + <i>Bac.licheniformis</i> 5514	Біоспорин	Україна	клітини	$(1-10) \cdot 10^9$
<i>Bac.subtilis</i> B-7812 + <i>Bac.licheniformis</i> B-7811	Імунобактерін-D	Україна	спори	$5 \cdot 10^8$
<i>Bac.subtilis</i> + <i>Bac.licheniformis</i>	Бактерін - СЛ	Україна	клітини	$(3-8) \cdot 10^{11}$

Дані табл.1 демонструють, що на ринку пробіотиків присутня достатня кількість біопрепаратів вітчизняного виробництва (монопрепарати містять *Bac.subtilis* або *Bac.amyloliquefaciens*, комплексні – *Bac.subtilis* разом із *Bac.licheniformis*). Тому питання використання економних (із врахуванням витрат часу і коштів) та ефективних схем ідентифікації 2-3 видів бацил для пробіотичних препаратів виробництва України залишається актуальним.

## 1.2 Оцінка якості бацилярних біопрепаратів та питання ідентифікації їх мікробної складової

Представники роду *Bacillus* є грампозитивними прямими паличками із закругленими кінцями, що розміщуються в парах чи ланцюжках (дипло- чи стрептобацили). Їх поодинокі чи у вигляді скупчень вегетативні клітини рівномірно зафарбовуються у певний колір, утворені в несприятливих умовах ендоспори мають вигляд не профарбованих овальних, сферичних або

циліндричних ділянок всередині клітини (рис. 1). По відношенню до  $O_2$  є аеробами чи факультативними анаеробами. Відношення до підвищених температур, кислотності середовища, концентрації солей, утилізації цукрів тощо у нешкідливих чи патогенних видів та штамів сильно варіює [12-14].

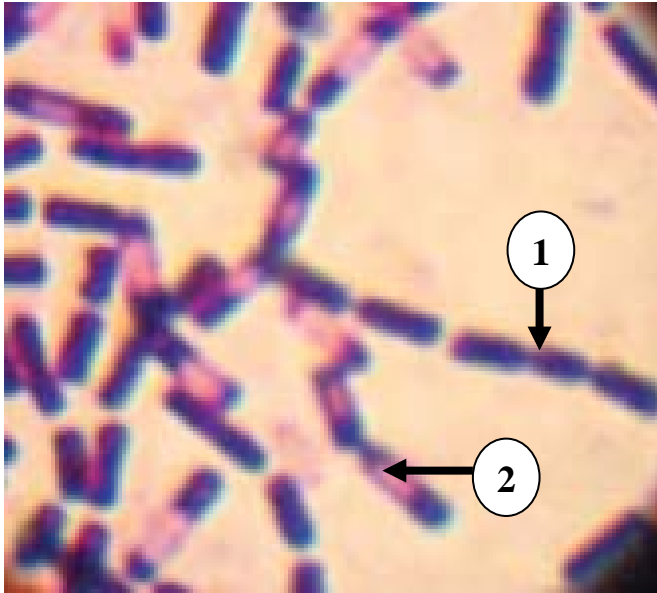
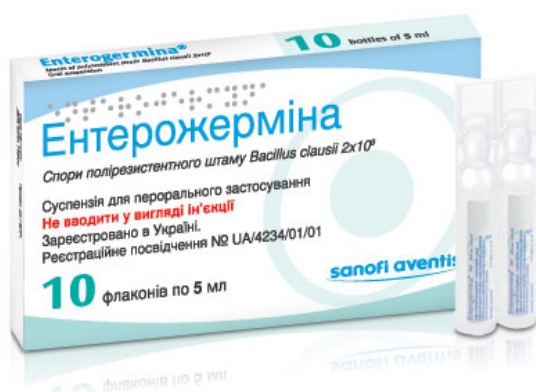


Рис. 1 Вегетативні клітини (1) ендоспори (2) у мікроорганізмів роду *Bacillus*.

Проблемою створення і використання бацилярних пробіотиків залишаються питання класифікації їх мікробних складових. Опис перших представників роду зроблено ще в 70-х роках 19 ст., але їх номенклатурний статус ще й досі не прояснено. Останній раз стандарти для таксонів роду *Bacillus* суттєво змінювали в 2002-2009 роках. В 2021 р. в матеріалах Міжнародного комітету з систематики прокариот (сайт [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)) з 574 назв, наведених для даного роду лише 94 (16%) вважаються опублікованими згідно з правилами. Тому бактеріальна складова пробіотиків, які використовували у ветеринарній практиці, досить часто визначається неправильно [6]. Так, назвою *Bac.subtilis* раніше позначали мікроби інших видів: *Bac.clausii* («Ентерожерміна» та «Домувар», Італія), *Bac.natto* («Глоген-8», США), *Bac.cereus* («Біосубтіл» від різних виробників, В'єтнам) (рис.2).



а



б



в

Рис. 2 Препарати пробіотиків, в яких спочатку було невірно визначено бацилярну складову:  
а – «Ентерожерміна»;  
б – «Домувар»;  
в – «Біосубтіл».

Через це в провідних лабораторіях, разом із вивченням фізіолого-біохімічних властивостей штамів бацил, використовують різні методи для виявлення генетичних ознак зазначених мікроорганізмів.

Але первинна ідентифікація тих чи інших штамів завжди розпочинається із вивчення їх культуральних ознак. На перший погляд здається, що за виглядом колоній такі бацили як *Bac.subtilis* та *Bac.licheniformis* легко розрізняються. Стандартний опис, наведений в багатьох джерелах для представників даних видів, має такий вигляд:

- *Bac.subtilis*. Колонії округлі, білі чи світло-сірі, пігментація від бежевого до рожевого, матові, непрозорі, поверхня мілкозерниста, зморшкувата та бархатиста, край рівний чи фестончастий;

- *Bac.licheniformis*. Колонії неправильної форми, тілесного кольору, сухі та щільні, з білим зернистим нальотом, краї хвилясті, поверхня шершава та рельєфна.

В ряді досліджень вказується, що у *Bac.subtilis* наявні як плоскі, так і опуклі варіанти з хвилястими або амебоподібними краями, із зернистою, складчастою, пласкою чи шершавою поверхнею, представлені на рис.3 [8,10,15,16].

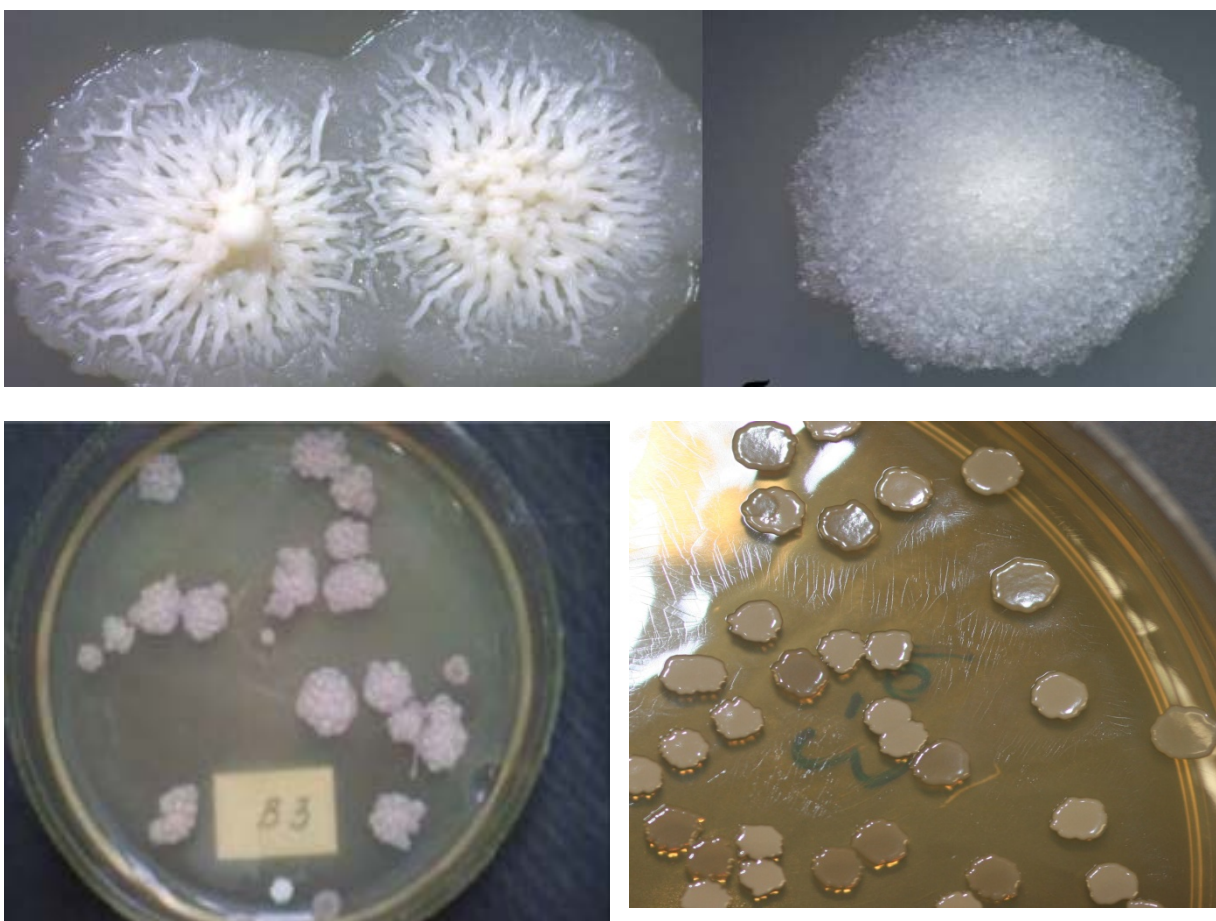


Рис. 3 Вигляд колоній у різних штамів *Bac.subtilis*.

Так само, і колонії *Bac.licheniformis* можуть бути не лише сухими, але й слизуватими та блискучими, з підвищеною або сильно розгалуженою поверхнею в центральній частині колонії (рис. 4). Тому доцільним є систематичне вивчення варіабельності колоній у бацил, викликане складом середовища, температурою культивування, віком культури, а головне –

гетерогенністю їх популяцій в природних системах, колекціях культур мікроорганізмів чи в біопрепаратах.



Рис. 4 Колонії різних штамів *Bac.licheniformis*.

Для 100% прояснення належності того чи іншого ізоляту до певного роду найкраще застосовувати сучасні молекулярно-біологічні методи: сиквенс-аналіз за допомогою автоматичних секвенаторів різних марок, дослідження тотальної ДНК, реакцію ампліфікації генів 16S рРНК за допомогою відповідних праймерів, різні види полімеразної ланцюгової реакції [17-19].

За неможливості проведення певною лабораторією чи конкретним фахівцем зазначених лабораторних процедур, ідентифікацію вдало проводять завдяки постановці біохімічних тестів, як в автоматичному, так і в ручному (чашечно-пробірочному) режимі.

В літературі, яка присвячена опису властивостей бактерій видів *Bac.subtilis* та *Bac.licheniformis*, за останні 25 років наведено десятки схем біохімічної ідентифікації ізолятів з різною тривалістю та складністю. В кінці 20 ст., для ідентифікації мікроорганізмів з роду *Bacillus* деякі дослідники мінімізували біохімічні дослідження і проводили розгорнуті бактеріологічні, з використанням наборів елективних, спеціальних чи диференційно-діагностичних середовищ [20]. Це було пов'язано з недоступністю для пересічних фахівців лабораторної діагностики в СРСР систем для

прискореного біохімічного аналізу – пластикових стрипів. Закордонні спеціалісти вже тоді використовували такі стріпи, разом із вивченням морфологічних ознак бацил, їх відношенням до певних факторів (жовч, кислоти, ріст при 45-60°C) (рис.5).



Рис.5 Пластиковий стріп тест-системи API-50 після проведення стандартних біохімічних реакцій

Дана система дозволяла провести близько 30 біохімічних реакцій в мініатюрних лунках (економія реактивів та часу протікання реакцій), з подальшим зчитуванням результатів згідно спеціальних ключів, наведених в паперових довідниках [21]. В 21 ст. провідним виробником таких тестів є фірма Biomerieux з Франції (<https://www.biomerieux.com>), яка має більше 40 виробничих філіалів в різних країнах світу. Її офіційним представником і постачальником зазначеного лабораторного обладнання в Україні є компанія «Ukrbio». Сучасні тест-системи, такі як API-50 СНВА, замість паперових довідників комплектуються програмним забезпеченням шляхом і дозволяють провести вже 50 та більше реакцій. В них можна перевірити здатність бацил до утилізації вуглеводів різної складності, гліцерину, етанолу, глікогену, казеїну, цитратів, нітратів, сечовини, індолу, неіоногенних поверхнево-активних речовин, виділення сірководню чи таких ферментів як каталаза і цитохромоксидаза [22,23]. Але вартість таких одноразових систем разом із комп'ютерними програмами є високою, тому уточнення і модернізація схем біохімічних досліджень для здійснення «ручного» режиму, безумовно, відповідає запитам фахівців-діагностів[16-19].

## Висновки до розділу 1

Бациллярні пробіотичні препарати рекомендовані для санації шлунково-кишкового тракту свиней, великої рогатої худоби (ВРХ), птиці та для лікування післяпологових ускладнень у ВРХ [24-28]. Заявлена концентрація бацил у вітчизняних препаратах має складати  $10^8$ - $10^{11}$  клітин чи ендоспор на грам. Перевірка відповідності складу препарату є стандартною процедурою на тих виробництвах, де пробіотики виготовляються. Так само, подібну перевірку, можуть замовляти чи виконувати самостійно, ветеринарні лікарі чи тваринники, як споживачі такої продукції. Задля ідентифікації мікробів комерційних біопрепаратів вивчають їх морфолого-культуральні ознаки (перший етап роботи). За цим обов'язково має відбуватись біохімічна ідентифікація бактерійної складової біопрепаратів. Послідовність та набір тестів в ній залежить від наявності певного обладнання та реактивів в конкретній лабораторії чи у практичного спеціаліста. Основні вимоги до стандартної чи модернізованої схеми ідентифікації – мала кількість витраченого часу, достатньо дешеві середовища та чіткий результат.



## РОЗДІЛ 2. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1 Матеріали і методи досліджень

Дослідження якості пробіотиків різних товарних форм та різних років випуску проводилось за стандартизованими методиками в декілька етапів [13,14, 29-36]:

1. підготовка лабораторного посуду та поживних середовищ перед висівом. Для всіх типів досліджень використовували лише стерильне обладнання: скляний посуд (чашки Петрі та пробірки бактеріологічні, піпетки на 1-2 см<sup>3</sup>, колби об'ємом 50-1000 см<sup>3</sup>, предметні скельця), металеве лабораторне обладнання (шпателі Дригальського, пінцети, фольга).

Стерилізацію обладнання різних видів здійснювали в лабораторіях факультету ветеринарної медицини (ФВМ), на кафедрі мікробіології, фармакології та епізоотології, кафедрі акушерства та хірургії. Чистий скляний посуд та металеві предмети знезаражували сухожаровою стерилізацією (обладнання загорталось в папір, оброблялось впродовж 1-1,5 год. при 165-170°C). Металеве приладдя при безпосередньому використанні додатково обпалювали на вогні (фламбували). Середовища різного складу та призначення стерилізували автоклавуванням.

Допоміжними матеріалами для проведених мікробіологічних досліджень були: ватно-марлеві корки, спирт для пальників, дозатори для піпеток.

Сертифіковані поживні середовища, склад яких наведено в Додатку А, призначались для виділення культур мікроорганізмів з препаратів пробіотиків, для їх наступної родової чи видової ідентифікації [35,36]:

- загальні середовища. Використовували для кількісних аналізів, для виділення окремих ізолятів під час перевірки якості препарату, для вирощування культур бацил в аеробних та анаеробних умовах (м'ясо-пептонний агар – МПА, м'ясо-пептонний бульйон – МПБ), для отримання біомаси чистих культур грибів-контамінантів (агар Чапека - АЧ);

- спеціальні середовища. За рахунок високої кількості одного з компонентів можливо вивчити толерантність мікроба до певного фактору чи його специфічну метаболічну активність. Ізоляти бацил вирощували на сольовому МПА (толерантність до кислот), МПБ з додаванням пептону (рівень кислотоутворення при використанні глюкози);

- спеціальні диференційно-діагностичні середовища. Наявність особливих компонентів та барвника в складі дозволяють через деякий час після висіву зафіксувати здатність мікроба до їх перетравлення (агар Ендо, агар Сімонса, середовище Гісса з манітом, середовище Гісса з ксилосою).

Кислотність середовищ (окрім забарвлених в червоний та синій кольору) контролювали за допомогою універсальних індикаторних папірців з кроком в 1 од. рН. Між використаннями колби з готовими середовищами зберігали у холодильнику за температури 4-6°C. Безпосередньо перед висівом середовища розплавляли та розливали в чашки Петрі чи пробірки (в залежності від методики досліду).

2. проведення висіву матеріалу препаратів пробіотиків (розведення  $10^{-6}$  та  $10^{-7}$ ) та аналіз особливостей росту мікробів в культурах. Глибинний висів, із відповідних розведень, проводили для отримання окремих колоній мікроорганізмів, що дозволяло провести в біопрепаратах кількісний облік бацил різних видів. Висів з пробірок останнього розведення робили в 2-х варіантах (рис.6).

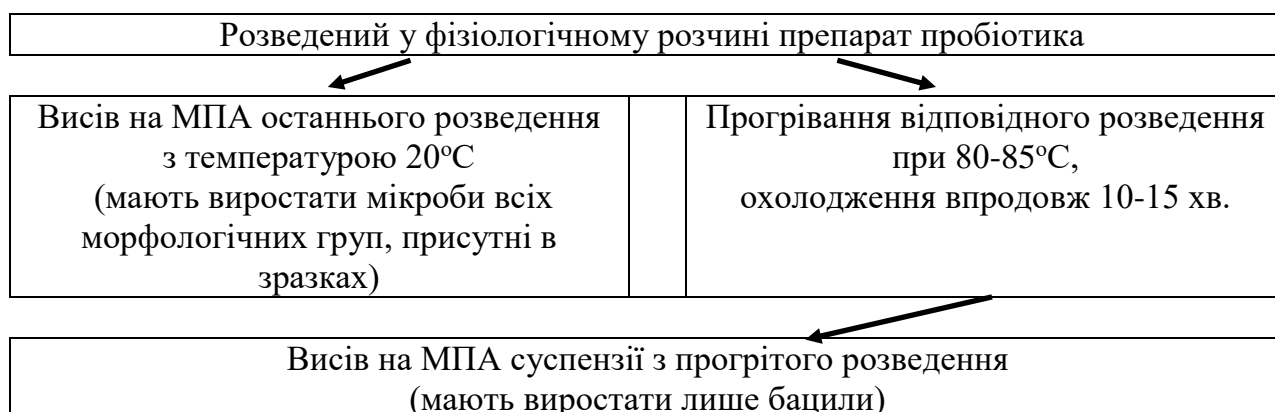


Рис. 6 Послідовність висіву суспензій пробіотика

При описі отриманих культур звертали особливу увагу на специфічні культуральні ознаки бацил та грибів: розмір колоній, вигляд їх країв, центру, периферії, структуру поверхні. У бацил такими мали бути середній або великий розмір колоній, повний або частковий блиск їх поверхні, слизуватість, різний ступінь хвилястості чи розгалуження країв, у грибів – великий розмір колоній, сухість, структура поверхні, вигляд центру, периферії та країв зрілої колонії.

3. робота з чистими культурами мікроорганізмів. Матеріал кожного ізоляту з накопичувальної культури (відповідна колонія) пересівали у на поживне середовище в нову чашку Петрі (поверхневий висів, прямі або хвилясті штрихи в чашках Петрі чи в пробірках). Пересіви проводили біля полум'я пальника, користуючись профламбованою металевією петлею, або одноразовою пластиковою (комбінація «петля-голка» виробництва США – рис.7).



Рис. 7. Висів штрихом чистої культури за допомогою пластикового обладнання (комбінація «петля-голка»)

Культуральні та морфологічні ознаки ізолятів чистих культур порівнювали із ознаками різних штамів для досліджуваних видів, наведених у літературі.

4. дослідження фізіологічних властивостей чистих культур мікроорганізмів. Проводили за допомогою ряду тестів, здійснених на твердих чи рідких середовищах (зразки інкубували в термостаті, за температури 37°C, впродовж 24-48 год.):

- здатність до анаеробного росту перевіряли уколом в стовпчик м'ясо-пептонного агару (МПА). Мікробний матеріал штриха чистої культури брали стерильною металевією чи пластиковією бактеріологічною голкою. Поверхню пробірки заливали 1 см шаром розплавленого парафіну для припинення будь-якого контакту із киснем повітря. Контролем слугувала точно така ж пробірка, з висівом тієї ж культури, але без парафіну.

- характер росту в м'ясо-пептонному бульйоні – МПБ. Мікробний матеріал штриха чистої культури стерильною металевією чи пластиковією бактеріологічною голкою вносили в бульйон.

- ріст на сольовому агарі. Тест виконували в чашках Петрі. Мікробний матеріал наносили у вигляді штриха.

- експрес-тест на виділення каталази під дією 3% або 6% пероксиду водню. Тест виконували в чашках Петрі (нанесення крапель  $H_2O_2$  на поверхню штриха) або на предметних скельцях (внесення мікробного матеріалу профламованою металевією петлею в краплю  $H_2O_2$ ).

- цукролітичні властивості мікробних культур визначали, перевіряючи здатність останніх до перетравлення вуглеводів (глюкоза) на МПБ з додаванням пептону, на скошеному агарі Ендо в пробірках (лактоза). Проводили глибинний висів (петлею в бульйон) або поверхневий (прямий штрих на поверхні скошеного агару Ендо).

5. мікроскопія мікробного матеріалу. Всі виділені ізоляти бацил та грибів досліджували за допомогою світлової мікроскопії (навчально-наукова лабораторія кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології, навчально-науково-клінічно-діагностична лабораторія ФВМ).

Для віднесення виділених мікробів до певної підгрупи чи роду виконували просте фарбування. Використовували 0,5% спиртовий розчин барвника кристалічного фіолетового (барвник – 2 г, етиловий спирт, 96% - 100 см<sup>3</sup>) чи спиртовий розчин фуксину. Мікробний матеріал профламованою металевією бактеріологічною петлею розподіляли на 1 см<sup>2</sup> предметного скла, фіксували полум'ям і заливали розчином відповідного

барвника на 1-2 хв. Після цього барвник зливали, препарат промивали значною кількістю  $H_2O$ , підсушували та досліджували під мікроскопом з імерсією.

Розкид коливань при здійсненні кількісних висівів проводили за допомогою пакетів стандартних комп'ютерних програм Microsoft EXCEL.

## 2.2 Характеристика місця виконання роботи

Різні форми пробіотики «Імунобактерін» (порошок, свічки) були надані українською компанією ТОВ «Біоконтакт» (рис. 8).



а



б

Рис. 8. Зовнішній вигляд досліджуваних форм пробіотики «Імунобактерин-Д»: а – свічки; б – порошок

Компанію, як сумісне підприємство із німецькою Biochem GmbH, створено у 2000 р. для продажу фармацевтичним підприємствам України («Дарниця», АО «Фармак», АТ Київський вітамінний завод тощо) відповідної сировини. З 2003 р. цільовим призначенням її діяльності стало сільське господарство: реалізація продукції знаних європейських постачальників, експорт підкислювачів та кормових добавок власного виробництва в європейські країни та на Близькій Схід, виробництво ветеринарних препаратів, технічних миючих засобів, обладнання для комбікормової промисловості [37].

В 2003 р., в якості структури «Біохем ЛТД», було створено підрозділ «Біохем Озера», який в 2006 р. став самостійною організацією під назвою «Кронос Агро» [38]. Фірма «Кронос Агро», основним дистриб'ютером якої є ТОВ «Біоконтакт», займається виробництвом таких інноваційних продуктів як імуномодулятори, пробіотики «Імунобактерін» та «Мультибактерин»,

кормові біокатализатори, засоби санації. Виробничі потужності підприємства даної фірми сертифіковані згідно європейських норм ISO-9001 та ISO-22000.

Пробіотик «Імунобактерин-D» використовується для оздоровлення організмів тварин різних видів, риб та бджіл, виробляється в формі нерозчинного чи водорозчинного порошку та вагінальних супозиторіїв (табл.2).

Таблиця 2. Сфери і форми застосування пробіотику «Імунобактерин-D»

№ з/п	Форма пробіотика, (термін придатності)	Призначення	Види тварин
1	Імунобактерин-D порошок (36 місяців з дати виробництва)	1. витіснення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів із ШКТ завдяки виділенню бактеріоцинів; 2. покращання перетравлення завдяки дії бактеріальних екзоферментів;	Свині, птиця, кролі, коні, ДРХ, ВРХ, промислові риби. 10 г/голову в день.
2	Імунобактерин-D водорозчинний (36 місяців з дати виробництва)	3. стабілізація бджолосімей, нормалізація обміну речовин комах	Бджоли. 5 г препарату додати до 5 мл води, внести в 150 мл цукрового сиропу
3	Супозит плюс, вагінальні супозиторії (24 місяці з дати виробництва)	Профілактика маститів, ендометритів, відновлення стану мікробної асоціації статевих шляхів після антибіотикотерапії	Інтравагінально свиноматкам, коровам, дрібній рогатій худобі

Імунобактерин-D у вигляді порошку містить запатентовані штами бактерій AX20 (*Bacillus subtilis* B-7812) та EA22 (*Bacillus licheniformis* B-7811) разом із представниками інших видів бацил (*Bacillus* spp). Депозитором зазначених штамів є приватне підприємство «Кронос Агро» [38]. В супозиторіях два зазначені види бацил знаходяться у співвідношенні 1:1, в кількості  $5 \times 10^8$  КУО/свічку [39].

Надані зразки досліджувались в лабораторіях ФВМ Поліського національного університету з використанням лабораторного обладнання (див. розділ 2.1 «Матеріали і методи досліджень») та таких приладів як сушильна шафа, автоклав, термостат, світловий мікроскоп (Primo Star Zeiss). Висіви мікробного матеріалу проводились в стаціонарному боксі, який до і після роботи обробляли миючими засобами та знезаражували 30-хвилинним УФ-опромінюванням. Всі маніпуляції з досліджуваним матеріалом

проводили над полум'ям спиртового пальника, в спецодязі (гумові рукавиці, шапочки, халати). Мікробні культури, контаміновані мікробами середовища та розчини по закінченні досліджень дезінфікували 40% розчином фенолу, кип'ятили або автоклавували.

### 2.3 Результати власних досліджень

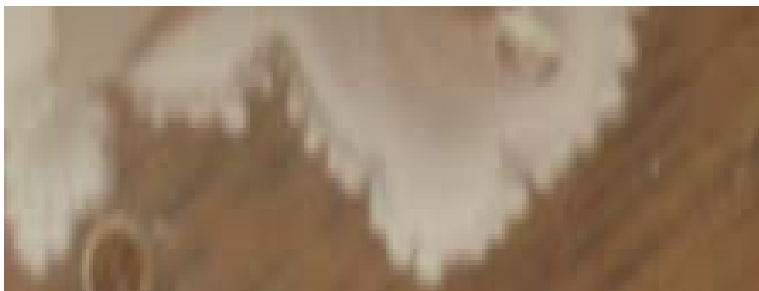
У сертифікатах на пробіотик «Імунобактерін-Д» наведено номери чи видові назви штамів мікроорганізмів, які є основою препарату, а їх заявлена концентрація складає  $10^8$  КУО/г. Така кількість бацил та їх здатність до швидкого росту дозволила за добу, в першому висіві із розведених в  $10^{-7}$  зразків, отримати на чашці Петрі достатню кількість ізольованих колоній з чіткими культуральними ознаками (рис.9,10). Із варіанту пробіотика Супозит плюс, до і після прогрівання, виділили 2 варіанти колоній, аналогічних деяким з «Імунобактеріну-Д» порошку.



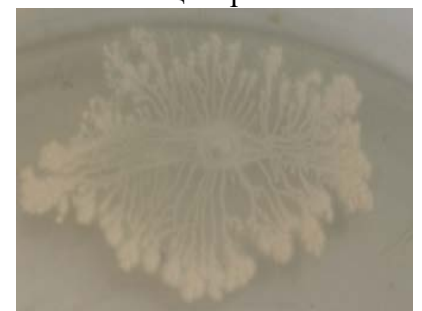
а «прозорий центр, хвилястий край»



б «горбкувата, крапка в центрі»



в «прозорий центр, вирости фестонами»



г «нитчаста поверхня»

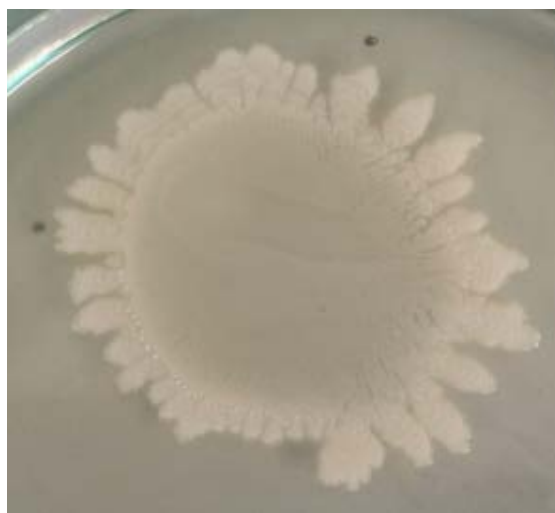
Рис.9 П'ять варіантів бацилярних колоній (а-д), виділені з «Імунобактеріну-Д» порошку при 20°C і після нагрівання при 80°C



д «розгалужені краї»



а «горбкувата»

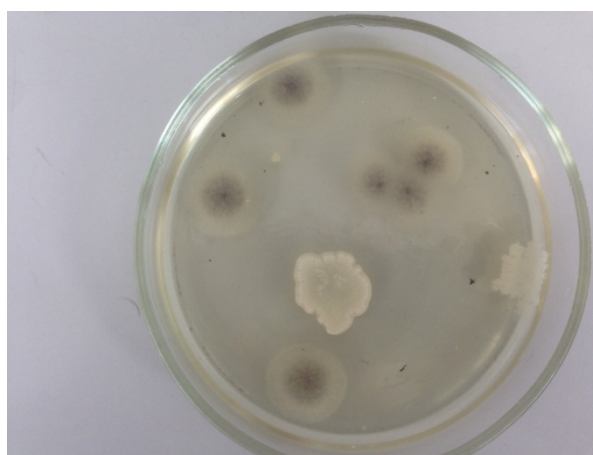


б «прозорий центр, вирости фестонам»

Рис. 10 Два варіанта колоній, виділених з «Імунобактеріну-D» супозит плюс

Належність цих колоній до бацил підтвердило прогрівання зразків при 80°C та повторний висів накопичувальної культури.

На жаль, із всіх досліджених форм «Імунобактеріну-D», у значній кількості, висівались колонії мікробів-контамінантів. Зважаючи на їх культуральні ознаки (розмір колоній 3-4 см, сухі, порошисто-волокнистий темний центр, світла напівпрозора периферія, ризоїдні краї), це були представники морфологічної групи грибів, а саме – міцеліальні гриби (рис.11,12).



а



б

Рис.11 Колонії грибів з порошку (а) та свічок (б) «Імунобактеріну-D».





а – вид зверху



б – зворотня сторона (реверсум)

Рис. 12 Волокниста структура центру колонії (а), наявність щільного центру, порошистої периферії та прозорих країв (б)

З 5-ти варіантів колоній, методом штриха, було отримано чисті культури (рис.13). Висока швидкість росту бацил дозволила за наступну добу (загалом 48 год. росту) накопичити достатню кількість мікробної біомаси для подальших досліджень. З ізоляту порошку, названого «...вирости фестонами по краю», було виділено ще 3 культури, які відрізнялись за своїми ознаками. Тому мікроскопічні та біохімічні дослідження проводили для 8-ми ізолятів (див. Додаток Б).

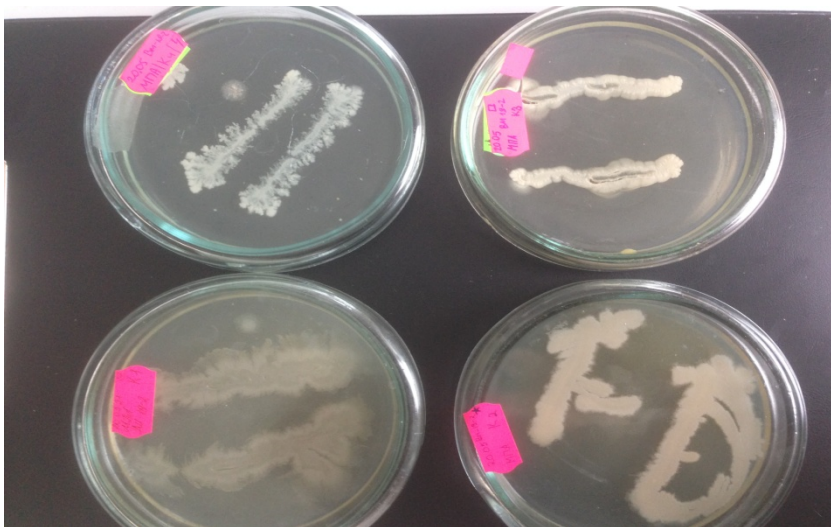


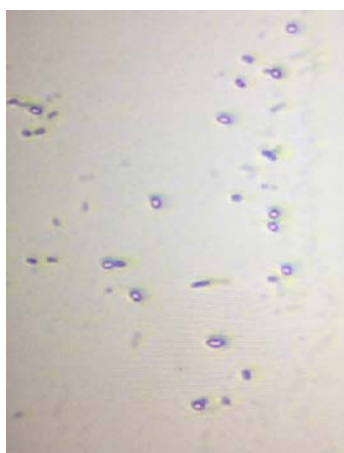
Рис. 13 Вигляд 4-х ізолятів чистих культур бацил

Матеріал бацилярних колоній через 24 год. росту, навіть без пересіву в чисту культуру, використали для визначення інтенсивності утворення ними такого ферменту як каталаза. Це було зроблено експрес-методом на предметному склі в краплі  $H_2O_2$  або шляхом нанесення пероксиду на поверхню колонії, що дозволило виділити ізоляти з подібними ферментативними властивостями (табл.3).

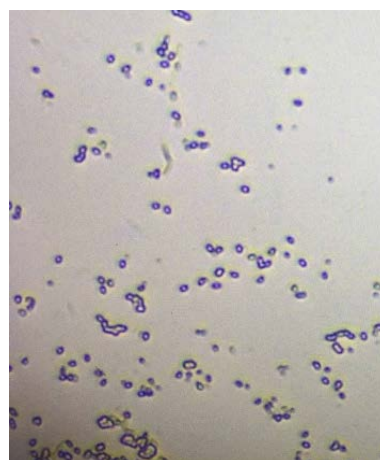
Табл. 3 Рівень каталази у ізолятів бацил

Номер, назва ізоляту	Концентрація пероксиду водню та інтенсивність виділення каталази ізолятами бацил	
	3%	6%
№1 двокольорова поверхня, край «паморозь»	++	++++
№2 товстий суцільний, хвилясті краї	+++	+++
№3 зім'ятий центр	++	++
№4 товстий суцільний, короткі гілкуваті вирости	+++	+++
№5 нитчаста поверхня	±	±
№6 суцільний типу «гірський хребет», блискучий верх	±	+
№7 прозорий центр, вирости фестонами	±	±
№8 горбкувата, крапка в центрі	+	+

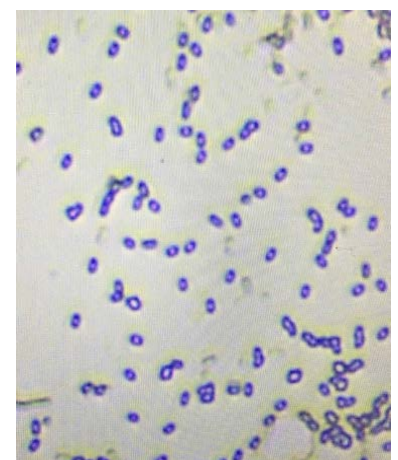
При світловій мікроскопії всіх ізолятів реєстрували короткі поодинокі чи зібрані в ланцюжки (з 2-5 клітин) паличкоподібні клітини, які дещо відрізнялись за розмірами та тинкторіальними властивостями (рис.14).



№5



№6



№8

Рис. 14 Мікроскопія ізолятів бацил

В препаратах з матеріалу колоній гриба-контамінанта виявили великі за розмірами спори та септовані гіфи, що підтвердило його належність до багатоклітинних міцеліальних грибів (рис.15).

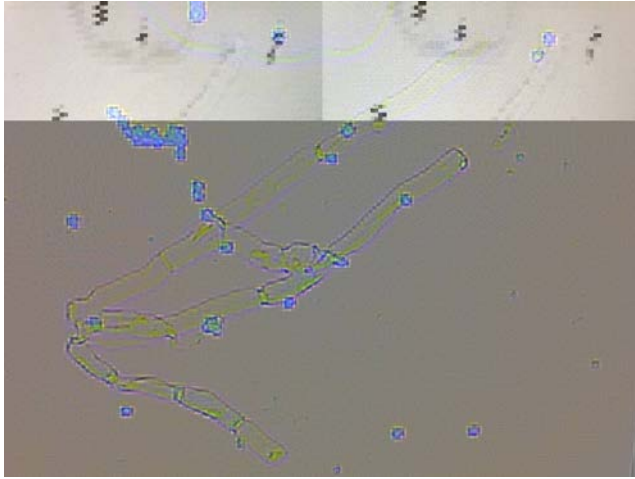


Рис. 15 Септовані гіфи, великі округлі спори гриба-контамінанту

Мікроби всіх 8-ми ізолятів виявляли толерантність до 75 г/л NaCl в складі сольового агару (табл.4). В таких умовах ізоляти №3,4,7,8 мали меншу інтенсивність росту, ніж інші, а особливості росту культур №1 та №2 майже не відрізнялися.

Табл. 4 Толерантність ізолятів бацил до високих концентрацій NaCl

Номер, назва ізоляту	Відношення NaCl	Характер росту ізолятів (інтенсивність росту, поверхня, вигляд країв)
№1 двокольорова поверхня, край «паморозь»	+	короткий штрих, непрозорий, крайові донні вирости з паличкоподібними короткими розгалуженнями
№2 товстий суцільний, хвилясті краї	+	довгий штрих, непрозорий, крайові донні вирости з паличкоподібними короткими розгалуженнями
№3 зім'ятий центр	±	короткий штрих, напівпрозорий, великі округлі крайові донні вирости з фестончастими короткими виростами
№4 товстий суцільний, короткі гілкуваті вирости	±	довгий штрих, напівпрозорий в центрі, білий на краях, крайові донні вирости з округлими короткими розгалуженнями
№5 нитчаста поверхня	+	товстий короткий штрих, непрозорий, донні ризоїдні вирости
№6 суцільний типу «гірський хребет», блискучий верх	+	довгий, непрозорий штрих з довгими ниткоподібними виростами
№7 прозорий центр, вирости фестонами	±	тонкий напівпрозорий штрих з коротенькими виростами
№8 горбкувата, крапка в центрі	±	тонкі напівпрозорі штрихи

Так само, у ізолятів розрізнялась здатність до перетравлення лактози, виявлена на скошеному агарі Ендо після інкубації зразків впродовж 24 год. при 37°C (рис.16). В позитивних тестах, коли мікроби ізолятів метаболізували лактозу, колір середовища в нижній частині стовпчика змінювався на безбарвний, в негативних – стовпчик залишався темно-малиновим.

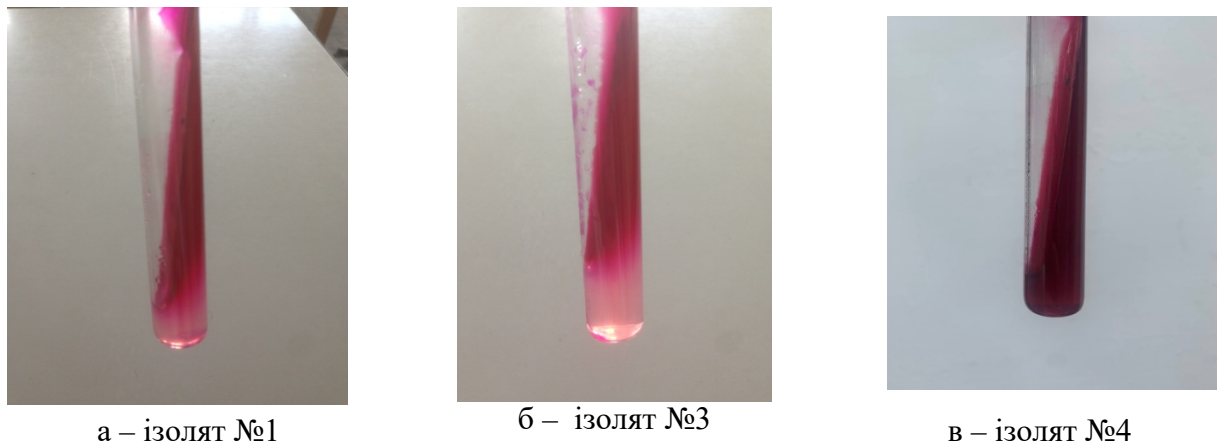


Рис.16 Позитивні (а,б) та негативний (в) тести на лактозу.

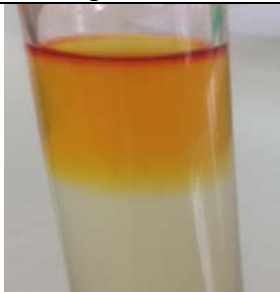







Під час розвитку в бульйоні (МПБ) у ізолятів відрізнялись: наявність поверхневої плівки, вигляд утворених плівок, ступінь і висота помутніння стовпчика бульйону, наявність осаду на дні пробірки (табл.5).

Табл. 5 Характер росту в МПБ через 24 год. культивування

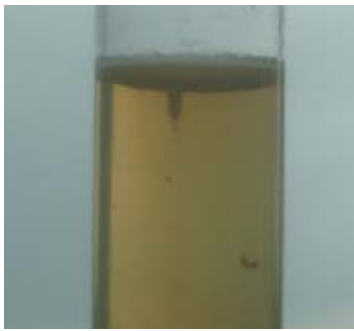
Номер, назва ізоляту	Характер росту ізолятів (інтенсивність росту, поверхня, <i>вигляд країв</i> )			Відношення до O <sub>2</sub>
	плівка	помутніння	осад	
№1 двокольорова поверхня, край «паморозь»	—	—	+	анаеробний ріст
№2 товстий суцільний, хвилясті краї	—	+ рівномірне	—	факультативний анаероб
№3 зім'ятий центр	+	+	+	факультативний анаероб
№4 товстий суцільний, короткі гілкуваті вирости	—	—	++	анаеробний ріст
№5 нитчаста поверхня	—	+ рівномірне	+	факультативний анаероб
№6 суцільний типу «гірський хребет», блискучий верх	+ тонка плівка	—	+	факультативний анаероб
№7 прозорий центр, вирости фестонами	± пристінкове кільце	±	++	факультативний анаероб
№8 горбкувата поверхня, крапка в центрі	+ щільна плівка	+ 1 см просвіту та рівномірне помутніння	—	аеробний ріст

Тест з метиловим червоним дозволив визначити особливості бродіння при перетравленні глюкози, здійснене кожним з ізолятів (табл.6) . Проведений тест, за особливостями забарвлення поживного середовища після внесення в нього індикатору, дозволив розділити ізоляти на 4 групи: жовте (№8), жовте з тоненьким червоним кільцем (№1), червоно-жовте (№3,№4,№6,№7), малиново-червоне (№2,№5).

Табл. 6 Реакція з метиловим червоним через 48 год. культивування

Номер, назва ізоляту	Реакція з метиловим червоним	Номер, назва ізоляту	Реакція з метиловим червоним
№1 двокольорова поверхня, край «паморозь»		№5 нитчаста поверхня типу «сніжинка»	
№2 товстий суцільний, хвилясті краї		№6 суцільний типу «гірський хребет», блискучій верх	
№3 зім'ятий центр		№7 прозорий центр, вирости фестонами	
№4 товстий суцільний, короткі гілкуваті вирости		№8 горбкувата поверхня, крапка в центрі	

Для уточнення здатності до анаеробного росту роздивлялись характер розвитку ізолятів в МПА під шаром парафіну проти контролю без парафіну (рис. 17). В стовпчику агару з доступом кисню всі ізоляти утворювали плівки з гладкою (№1,№2,№4,№5) або зморшкуватою поверхнею (№3, №6-8) і штрих, довжиною в 1-3 мм. Штрих виростав в тій частині поверхні, куди завдяки уколу міг потрапляти кисень повітря.



при доступі O<sub>2</sub>,  
контроль №3



без O<sub>2</sub>, №3



без O<sub>2</sub>, №5

Рис. 17.  
Ріст  
ізолятів  
після  
висіву  
уколом в  
МПА

Під час росту в МПА без кисню більшість ізолятів здатні до анаеробного росту, окрім варіанту №8. Утворені штрихи мають вигляд або чітких вузьких конусів довжиною 2-3 см (№1,№4, №5, №6), або дифузних конусів (№2). У двох ізолятів на краях штрихів утворюються пелюсткоподібні (№3) або округлі (№7) вирости.

## Висновки до розділу 2

В різних формах пробіотику «Імунобактерін-D» (порошок, свічки) наявні клітини паличкоподібних бактерій із спільними ознаками:

- витримують кип'ятіння без втрати життєздатності;
- на м'ясо-пептонному агарі утворюють колонії діаметром 1-4 см;
- толерантні до високих концентрацій хлориду натрію;
- належать до факультативних анаеробів.

Одночасно доведено, що у ізолятів різняться здатність до анаеробного росту та до перетравлення лактози, спектр продуктів, виділених під час перетравлення глюкози, рівень виділення каталази.

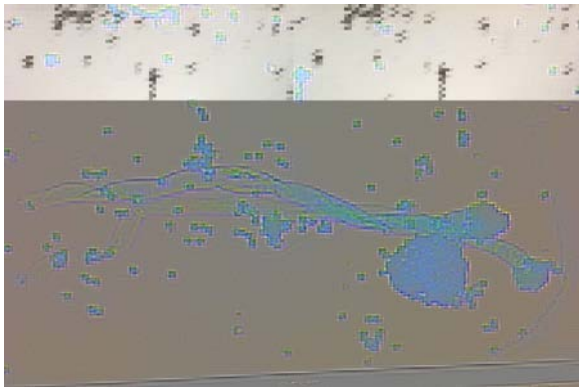
### РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Первинні висіви в розведеннях  $10^{-7}$  та  $10^{-6}$  дозволили встановити, що в пробіотику «Імунобактерін-D» міститься певна кількість клітин бацил:

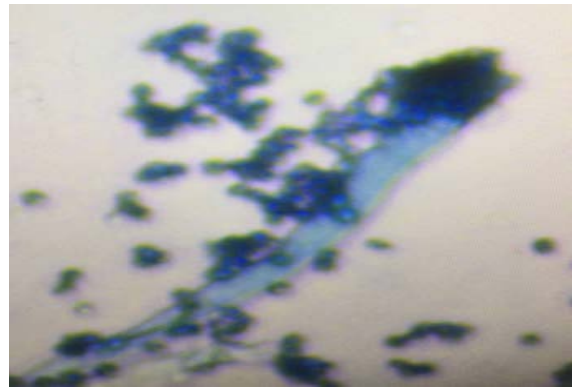
- із свічок Супозит плюс виділяються 2 види мікроорганізмів – ізоляти №7 та №8 (рис.10). Вони містяться в препараті в співвідношенні 1:1, їх кількість змінюється в інтервалі  $(2,2 \pm 0,28) \cdot 10^7$  колонієутворюючих одиниць/г;
- із порошку висіяні ті самі 2 види мікробних колоній та ще 6 інших ізолятів бацил в кількості  $(3,5 \pm 0,54) \cdot 10^7$  колонієутворюючих одиниць/г (рис.9);

На жаль, в 2-х формах пробіотику визначені цифри щодо кількості діючих мікробів в 10 разів менші, ніж наведені в сертифікатах. Але 8 штамів *Bacillus spp* в порошку і за такої кількості мають ефективно сприяти одному з варіантів призначення даного варіанту пробіотика – покращанню конверсії корму. Досліджені бацили виділяють кислоти (молочну, бурштинову та оцтову) при розкладанні глюкози в присутності білків та пептидів: велику кількість варіанти №1 та №8, значно меншу – №3, №4, №6 та №7 (табл.6). Через виділення кислот при бродінні рН середовища стає меншим за 4,5, що і спричинює зміну кольору індикатору з червоного на жовтий [45]. Штами №2 та №5, зброджуючи глюкозу, спочатку утворюють з неї піруват, а надалі – проводять інші реакції, головними продуктами бродіння в яких є етиловий та бутиловий спирти. Закислення середовища під час дії свічок в статевих шляхах також може призвести до елімінації ряду патогенних мікробів, оптимальна кислотність для яких має бути близька до нейтральної.

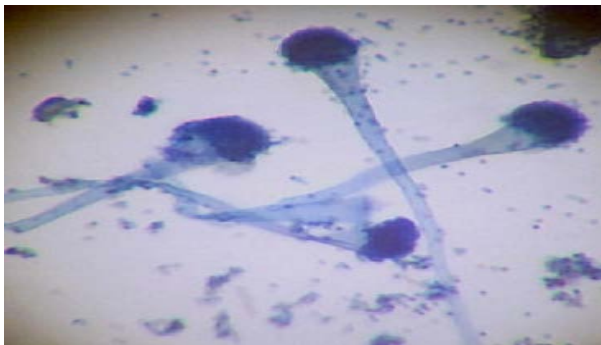
В кожному варіанті препарату, в 60% висівів наявні гриби (рис.18), які після консультацій із підручниками та довідниками віднесено до виду *Aspergillus fumigatus* [41-44]. Кількість контамінантів в свічках набагато менша, ніж в порошку, що імовірно пов'язано із проблемами стадії фасування на підприємстві компанії «Кронос-Агро».



а



б



в



г

Рис. 18 Вигляд репродуктивних структур грибів-контамінантів в мікроскопічних препаратах: а, б – висіви з пробіотику; в, г – фото з літературних джерел.

Зазначений представник аспергилів є облігатним анаеробом, тому не зможе розвиватись ні при санації статевих шляхів, ні при оздоровленні мікробіому шлунково-кишкового тракту. Але за його наявності виробникам, оптовим продавцям чи роздрібним споживачам потрібно звертати особливу увагу на умови збереження препаратів для недопущення утворення цими грибами мікотоксинів (зволоження препарату, коливання температури від 4°C до 25°C).

Ізолят №8, названий «горбкувата поверхня, крапка в центрі» був виділений із всіх форм препарату. За культуральними ознаками (колір, тм'яність, шорохувата поверхня, хвилястий край) відповідає таким у мікробів виду *Bacillus subtilis*. Отримані колонії є типовими шорохуватими R-формами, характерними для представників даного виду через відсутність



гідрофільних поліцукрів в їх оболонках [15]. Так само, цей ізолят не схильний до анаеробного росту ні в бульйоні, ні в стовпчику агару, толерантний до хлориду натрію, виділяє величезну кількість кислот, що підтверджується в тесті з метиловим червоним, повільно розкладає лактозу при рості на агарі Ендо.

Необхідно звернути увагу на той факт, що всі маніпуляції щодо виявлення рівня перетравлення лактози з агару Ендо потрібно проводити в пробірках на скошеному агарі, а не на чашках Петрі. Імовірно, зазначені біохімічні реакції у більшості виділених бацил краще проходять за умов дефіциту  $O_2$ . Тому продукти перетворення лактату накопичуються саме в нижній частині стовпчика диференційно-діагностичного середовища (рис.16).

Культуральним ознакам виду *Bacillus licheniformis* при порівнянні з літературним даними (рис.4) найкраще відповідав ізолят за №3 з назвою «зім'ятий центр». Він краще розвивався в анаеробних умовах в МПБ, в стовпчику МПА виростав у вигляді штриха із розвиненими бічними виростами, був толерантним до NaCl, в тесті з метиловим червоним демонстрував середній рівень виділення кислот ( $\pm$ ), повільно розщеплював лактозу ( $\pm$ ).

У випадку потреби точної ідентифікації представників зазначених видів пропонуємо скористатись розробленою нами схемою (табл.7), за якою штами різних видів *Bac.subtilis* та *Bac.licheniformis* можливо ефективно та недорого ідентифікувати в 3 етапи.

За 1-шу добу (24 год. після первинного висіву) можливо провести кількісні обрахунки, виявити 100% контамінантів (неспороутворюючі бактерії, гриби), вивчити культуральні ознаки бацилярних колоній, здатність у них росту при  $50^{\circ}C$  та за присутності високих концентрацій NaCl, здатність до виділення каталази.

За 2-гу добу (48 год. росту культур) – отримати чисті культури, вивчити їх культуральні та морфологічні ознаки, отримати результати росту мікробів

на сольовому та крохмальному агарі, в м'ясо-пептонному бульйоні, провести тест з метиловим червоним та поставити ще 8 біохімічних тестів.

Табл. 7. Послідовність ідентифікації бацил комерційних біопрепаратів [46]

№ з/п	Характеристики	Принципи виявлення ознаки	Назва виду (час виконання)	
			Vac.subtilis	Vac.licheniformis
Порівняння рівня метаболічної активності ізолятів при вивченні спільних ознак				
1	Ріст при 50° С	Ізольовані колонії з первинного висіву пересівають на МПА, в МПБ, МПА з хлоридом натрію, агар з крохмалем.	+ (24 год.)	+ (24 год.)
	Ріст в бульйоні з наступним внесенням метилового червоного		+(24 год.)	+(24 год.)
2	Ріст в присутності 7,5% хлориду натрію		+ (24 год.)	+ (24 год.)
3	Розщеплення крохмалю		+ (24 год.)	+ (24 год.)
4	Розщеплення манітолу	Укол чистої культури в стовпчик середовища Гісса з манітом. Зміна кольору (фіолетовий-жовтий)	+ (24 год.)	+ (24 год.)
5	Виділення каталази	Ізольовані колонії первинного висіву обробляють H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+
Вивчення відмінних ознак				
6	Ріст в анаеробних умовах	Ізольовані колонії первинного висіву, укол в МПА (закритий шаром вазеліну чи парафіну та без даної речовини).	– (24 год.)	+ (24 год.)
7	Виділення сірководню	Висів чистої культури на скошений агар Клінгера в пробірках. Почорніння середовища.	– (24 год.)	+ (24 год.)
8	Утилізація ацетату	Ізольовані колонії первинного висіву пересівають на ацетатний агар в чашках Петрі. Зміна кольору (зелений – синій)	– (24-72 год.)	+ (24-72 год.)
9	Утилізація цитрату	Ізольовані колонії первинного висіву пересівають на агар Симмонса в пробірках Петрі. Зміна кольору (синій – зелений)	– (24-72 год.)	+ (24-72 год.)
10	Розщеплення аргініну	Висів чистої культури в аргініновий бульйон. Зміна кольору (пурпурний-лиловий)	+ (24-48 год.)	± (24-48 год.)
11	Розщеплення ксилози	Укол чистої культури в стовпчик середовища Гісса з ксилозою. Зміна кольору (фіолетовий-жовтий)	+ (24 год.)	± (24 год.)
12	Розщеплення лактози	Висів чистої культури на скошений агар Ендо в пробірках. Знебарвлення середовища в нижній частині стовпчика агару.	– (24 год.)	± (24-48 год.)

За 3-тю, 4-ту добу (72-96 годин росту) можна проаналізувати результати всіх реакцій і провести остаточну ідентифікацію біоваріантів зазначених видів.

Ряд інших колоній накопичувальних культур (рис.9 – «прозорий центр, хвилястий край», «прозорий центр вирости фестонами», «розгалужені краї») за культуральними ознаками нагадують колонії, характерні для виду *Bac. amyloliquifaciens* (рис.19).

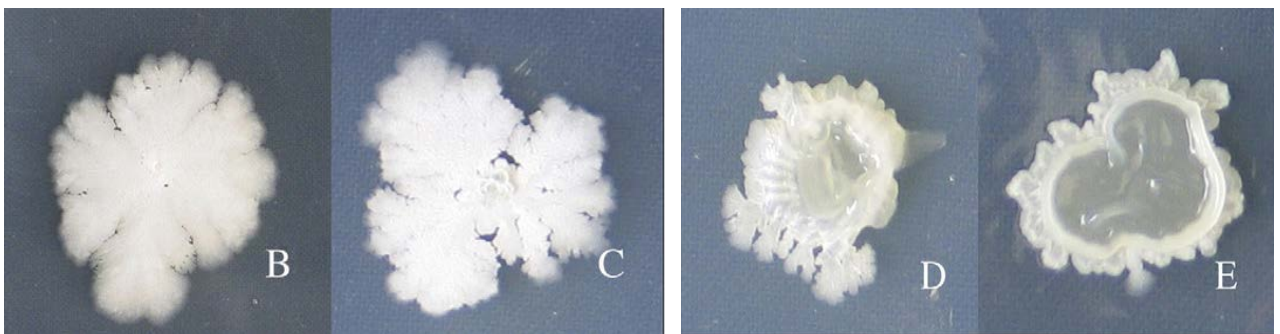


Рис. 19. Колонії штамів виду *Bac. amyloliquifaciens* за даними літератури

Даний вид є корисним непатогенним мікроорганізмом і стандартним компонентом певних пробіотичних препаратів. Присутність цих бацил в комплексних препаратах пробіотиків може бути доцільною у варіанті «Імунобактерин – D» порошок, для якого в сертифікаті заявлена суміш бацил. Але цих колоній не може бути в Супозит плюс, тому їх наявність свідчить про певні проблеми виробництва (під час виготовлення різних партій продукту не забезпечене чітке, стерильне розділення технологічних процесів).

### Висновки до розділу 3

В різних формах препарату (порошок, свічки) містяться 2 види бацил. Зазначені мікроби, за умов дефіциту кисню та високій концентрації солей, активно розкладають глюкозу (з виділенням органічних кислот чи спиртів), білки та пептиди. Це дозволяє їм сприяти перетравленню корма та елімінації патогенних мікробів в ШКТ чи статевих шляхах. Разом з цим і в порошку, і в свічках присутні як бацилярні, так і грибні контаміанти.

## ВИСНОВКИ ТА ПРОПОЗИЦІЇ

1. В різних формах пробіотика знаходяться бацили в кількості  $(2,2 \pm 0,28) \cdot 10^7$  КУО/г (порошок) та  $(3,5 \pm 0,54) \cdot 10^7$  КУО/г (свічки). Отримана кількість 10 разів менша за сертифіковані значення.

2. У всіх формах препарату містяться контамінанти – міцеліальні гриби виду *Aspergillus fumigatus*, а в Супозит плюс (свічки) реєструються ще й бацили виду *Bac. amyloliquifaciens*, незаявлені в сертифікати на даний тип біопрепарату, що говорить про певні проблеми на стадіях виробництва та фасування продукту.

3. Основними бактерійними складовими препаратів є бацили видів *Bac.subtilis* та *Bac.licheniformis*, для ідентифікації яких запропоновано схему поетапного визначення фізіологічних ознак.

4. Наявність в складі пробіотика імовірних продуцентів мікотоксинів потребує уваги під час збереження товарних форм біопрепарату для унеможливлення накопичення токсичних мікробних метаболітів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Циммерман Я.С. Илья Ильич Мечников: история жизни и научные свершения. Клиническая фармакология и терапия, 2018. №3
2. Глобальні практичні рекомендації World Gastroenterology Organisation 2008. 24 с.
3. Калініченко С. В., Коротких О. О., Тищенко І. Ю. Порушення мікроекології та її сучасна корекція. Огляд. УКРАЇНСЬКИЙ БІОФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ, № 2 (43) 2016. С. 6-12
4. Скрышник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике. *Сучасна гастроентерологія*. № 3 (47). 2009.С. 81-90.
5. Осипова И.Г., Михайлова Н.А., Сорокулова И.Б., Васильева Е.А., Гайдеров и др. Споровые пробиотики. *Журнал микробиол.эпидемиол. и иммунол.* 2003. № 3.С. 113-119.
6. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // *Хим. и биол. безопасность*. 2007. № 2 (3). С. 20-41.
7. Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. Sporeformers as human probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus. *Compr. Rev. Food Science and Food Safety*. 2003. Vol. 2. P. 101-110.
8. Бабич О.О., Касымов С.К., Линник А.И., Митрохин П.В., Кригер О.В. Идентификация и анализ биохимических свойств штамма–продуцента кератиназы. *Электронный научный журнал «Современные проблемы науки и образования»*. 2013. №6.
9. Абатуров А.Е., Бабич В.Л. Иммуностропное действие пробиотических штаммов Bacillus clausii. «Pediatrics. Eastern Europe» 2016. v.4. №4. P.532-541.
10. Радченко М. М., Бейко Н. Є., Андріяш Г. С., Тігунова О. О., Шульга С. М. Виділення та ідентифікація штаму-продуценту рибофлавіну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Том 24. С. 154-159.

11. Сафронова Л. А., Осадчая А. И., Иляш В. М., Мишак Е. В. Бактерии рода *BACILLUS* – активные продуценты гидролитических ферментов. *Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. Біологія*. 2006. Вип. 19. С.155–159.
12. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер с англ. /под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейнли, С. Уилльямса/. Москва: Мир, 1997. С.567.
13. Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. 98 с.
14. Васильев Д.А., Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф. Бактерии *Bacillus cereus* и межвидовая рекомбинация с *Bacillus anthracis* как угроза здоровью человека. Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. 88с.
15. Иркитова А.Н., Гребенщикова А.В., Яценко Е.С., Сперанская Н.Ю., Мацюра А.В. Морфологическое разнообразие *Bacillus subtilis*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 2018. 8(2). С. 365-370.
16. Бибен И.А. Морфологические, биохимические и биологические свойства пробиотических культур *Bac. subtilis* штаммы ВІ-9 И ВІ-12. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного факультету. Ветеринарні науки*. 2015. №3(37). С.125-129.
17. Сацуневич Н.Е., Прокулевич В.А., Титок М.А. Идентификация природных бактерий, перспективных в пробиотическом отношении. *Вестник БГУ. Сер. 2*. 2012. № 1. С.66-70.
18. D.R. Zeigler, J.B. Perkins. The Genus *Bacillus* Practical. Handbook of Microbiology. Second Edition. /під ред. E. Goldman, L. H. Green /. Нью-Йорк: CRC Press Taylor & Francis Group. 2009. P.309-326.
19. Пархоменко Т. Ю., Новиков И.А. Новый перспективный штамм *BACILLUS SUBTILIS*. *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн*. 2015. № 3-4 (12). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2045>.

20. Феоктистова Н.А., Калдыркаев А. И., Мустафин А.Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*. *Биологические науки*. 1995. С.288-290.
21. Santini F., Borgnetti V., Amalfitano G., Mazzucco A. *Bacillus licheniformis* Prosthetic Aortic Valve Endocarditi. *Jornal of clinical microbiology*. 1995, Vol.33, № 11, P. 3070–3073.
22. Mitra A., Mukhopadhyay P.K., Homechaudhuri S. Understanding probiotic potentials of *BACILLUS* bacterial population isolated from *CHITALA CHITALA* (Osteoglossiformes; Notopteridae) by comparing the enzyme activity *in vitro*. *International Journal of Pure and Applied Zoology*. 2014. Vol. 2, P.120-127.
23. Andriani Y., Safitri R., Rochima E., Fakhrudin S. D. Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)/ *NUSANTARA BIOSCIENC.*, 2017. Vol. 9, No. 2, P. 188-193.
24. Юлевич О.І., Лихач А.В., Дехтяр Ю.Ф. Ефективність використання пробіотиків у годівлі помісних поросят на дорощуванні. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2017. Т 19. № 74. С. 91-94.
25. Леонтьева И.Л. Физиологический статус телят в раннем постнатальном онтогенезе и способ его коррекции / И.Л. Леонтьева. Москва: ООО «АР-Консалт», 2017. 84 с.
26. Вальчук С.І., Шевченко Т.М., Шевченко В.А., Воронкова О.С., Вінніков А.І. Корекція дисбактеріозу піхви з використанням пробіотиків. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. 2015. 6(1). С.74-78.
27. Феоктистова Н.В., Марданова А.М., Хадиева Г.Ф., Шарипова М.Р. Пробиотики на основе бактерий рода *BACILLUS* в птицеводстве. *Ученые записки Казанского университета. Сер. Естественные науки*. 2017, Т. 159, кн.1. С.85–107.

28. Казаков А. С. Использование ферментно-пробиотического комплекса при выращивании цыплят-бройлеров. Диссертация на соискание ученой степ. канд. с.-х. наук. пос. Персиановский, 2016. 128 с.
29. Лысак, В. В. Микробиология. Практикум: пособие / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, О. В. Фомина. Минск: БГУ, 2015. 115 с.
30. Vanderhitte J., Engbaek K., Piot P., Neuck S.C. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии 1. Бактериологические методы. 2. Диагностика, лаборатория – методики. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1994. 132 с.
31. Климнюк С.І, Ситник І.О., Творко М.С., Широбоков В.П. Практична мікробіологія: посібник. Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. 440с.
32. Методы общей бактериологии: под ред. Герхарда, пер. с англ. Москва: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
33. Методы общей бактериологии: под ред. Герхарда, пер. с англ. Москва: Мир, 1984. Т. 1. 536 с.
34. Красноженов Е.П. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний / Красноженов Е.П., Карпова М.Р., Ильинских И.Н. и др. Ростов -на-Дону: Фенікс, 2006. 256 с.
35. Цитологія мікроорганізмів: методичні рекомендації до спец практикуму «Цитологія мікроорганізмів». / Упорядники: М.Г. Сергійчик, О.С. Радченко, Л. Г. Степура, Т. М. Фурзікова. Київ: Фітоцентр, 2000. 48 с.
36. Научный центр Himedia. Готовые питательные среды. Вебсайт. URL: <http://www.himedialabs.ru> (дата звернення 1.04.2021).
37. БИО КОНТАКТ. Кормові добавки та дезінфектанти. Вебсайт. URL: <http://biocontact.com.ua> (дата звернення 5.06.2021).
38. Приватне підприємство Кронос-Агро. Вебсайт. URL: <http://kronos-agro.com> (дата звернення 5.06.2021).
39. Каталог депонованих штамів мікроорганізмів. Вебсайт. URL: <http://ucm.org.ua/wp-content/uploads/2020/10/КАТАЛОГ-укр-депон-25.09.2020.pdf>



40. Приватне підприємство Кронос-Агро. Вебсайт. URL: <http://kronos-agro.com/product/supozyt-plus/> (дата звернення 5.06.2021)
41. Переведенцева Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы: учебное пособие. Пермь: Пермский гос. ун-т., 2009. 199 с.
42. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 225 с.
43. Мюлер Э., Лефлер В. Микология: Пер.с нем. Москва: Мир, 1995. 134 с.
44. Кириленко Т.С. Атлас родов почвенных грибов. Киев: Наукова думка, 1977. 127 с.
45. Шлегель Г. Современная микробиология. Москва: Мир, 2002. 567 с.
46. Солодка Л.О., Рибачук Ж.В., Клішевич В.І. Ідентифікація мікроорганізмів певних видів у бацилярних про біотичних препаратах. *Збірник тез міжн. наук.-практ. конф. «Біобезпека, захист та благополуччя тварин»* (21 травня 2021 р.). Київ, 2021. С.27-31.