

УДК 619:636.52/58.087.8:612.1
© 2018

І.А. БІБЕН,
кандидат ветеринарних наук

Дніпровський державний
аграрно-економічний університет,
Україна
E-mail: bibenvet@ukr.net
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро

МІКРОБІОЛОГІЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ
AEROCOCCUS VIRIDANS
ШТАМ VI-07

*Рутинними бактеріологічними методами ізольовано культуру індигенного нерезидентного аерокока, який володіє цінними пробіотичними потенціями. Мікробіологічні характеристики ізольованого аерокока скановано за допомогою загальноприйнятих бактеріологічних методів відносно стрептококів. На підставі аналізу кардинальних біологічних властивостей з використанням визначника Берджи ідентифіковано видову належність ізольованої культури прокаріоту – *Aerococcus viridans*. Культуру депоновано як виробничий штам VI-07 для використання як пробіотик у складі симбіотичного препарату “Субаерін”. Штам володіє типовими для виду властивостями: грамнегативний аерокок, нерухомий, безкапсульний, факультативний анаероб, хемоорганотроф з окисним типом метаболізму, сапрофіт, нерезидентний прокаріот покривних тканин з високим колонізаційним потенціалом і антимікробним антагонізмом, продукуючий біологічно активні фізіологічно необхідні речовини.*

Ключові слова: *A. viridans* штам VI-07, пробіотик, індигенна культура, біологічно активні речовини, мікробіологічні властивості.

Постановка проблеми. З розвитком науково-технічного прогресу, глобалізації економіки, з поліпшенням фізіологічних параметрів життєдіяльності людини зростає й науковий інтерес до нормальних мікробіальних процесів, що відбуваються в макроорганізмі в стані здоров'я, за відсутності патолофізіологічних змін. Нормалізація процесів життєдіяльності макроорганізму розглядається як динамічний процес прямих і зворотних зв'язків саморегулюючих біологічних систем, еволюційно запрограмованих на відновлення виникаючих відхилень від стану фізіологічної норми. І в цьому аспекті вивчення якісного і кількісного складу нормофлори макроорганізму, особливо мікробіального угруповання кишечника, є актуальним і перспективним напрямом у розробці

механізмів відновлення порушених функцій за допомогою корекції мікробіального пейзажу відкритих порожнин і покривних тканин організму [3–6, 11, 12].

Нормальна мікрофлора макроорганізму у своїй сукупності формує динамічний мікробіальний орган – мікробіоту, який включає сотні різноманітних видів мікроскопічних істот із загальною чисельністю мікроорганізмів понад 10^{11} – 10^{13} живих мікробних клітин, при цьому видовий склад і популяційний рівень різних організмів мікробіоценозу корелює з локалізацією і функціональним значенням біотопу мікробіонта [1–3, 6, 8–10].

Нормальна мікрофлора у складі мікробіоти макроорганізму виконує ряд життєво важливих фізіологічних функцій щодо підтримки внутрішнього гомеостазу організму, а саме:

- опосередковано колонізаційну резистентність покривних тканин за допомогою формування біоплівки і антимікробного антагонізму;

- детоксикаційну функцію за допомогою гідролізу ксеногенних з'єднань;

- синтетичну діяльність у процесі створення біологічно активних речовин;

- допоміжну функцію травлення в кишечнику за рахунок дії екзоферментів зовнішньої деструкції поживних речовин [3–6, 9, 10, 12].

На підставі численних досліджень вітчизняних і закордонних мікробіологів встановлено, що нормальна мікрофлора у складі мікробіоти являє собою цілісну біологічну систему, яка складається з мікробних популяцій різного таксономічного підпорядкування зі специфічними біофункціями у формі надорганізмової біосоціальної системи, з відповідними властивостями мікробної колоніальної організації та біокомунікації в результаті еволюційно консервативних, хімічно ідентичних або гомологічних універсальних функціональних блоків, специфічних у різних форм організмів мікробіоценозу. Ці універсальні біосоціальні мікробіоасоціативні системи беруть участь в ефективному контролі і регуляції фізіологічного гомеостазу внутрішнього середовища макроорганізму [3–5, 7–12].

Одним з біологічно перспективних і фізіологічно активних нерезидентних індигенних прокаріотичних мікроорганізмів, що беруть участь у контролі і регуляції якісного та кількісного складу мікробної популяції слизових оболонок порожнинних органів, є пробіотична культура роду аерококів – *A. viridans*, яка продукує перекис водню, супероксидний радикал, біологічно активні речовини і низькомолекулярні регуляторні пептиди з антимікробною активністю [3–5, 11, 12].

Мета досліджень: вивчити загальноприйнятими методами бактеріологічного дослідження мікробіологічні характеристики ізолюваної нами індигенної пробіотичної культури *A. viridans* штаму BI-07.

Матеріал та методи. Бактеріологічне дослідження біологічного матеріалу при ізоляції пробіотичної індигенної нерезидент-

ної культури аерокока віриданс проводили в НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпровського ДАЕУ. Морфотинкторіальні, біохімічні, біологічні та антигенні властивості пробіотичної індигенної культури *A. viridans* штаму BI-07 вивчали за допомогою загальноприйнятих методик бактеріологічного дослідження [1]. Культивували бактерії на збагачених простих середовищах МПБ та МПА на ОПХ (основа перевару Хотінгера) за 37–38 °С протягом доби.

Кількість живих мікробних клітин (ж.м.к.) пробіотичної культури визначали культуральним методом, посівом десятикратних розведень суспензії прокаріот на елективний поживний агар з подальшим підрахунком колоній, які виростили.

Кількісні показники експериментальних досліджень обробляли за допомогою пакета прикладних статистичних програм Excel 2000. З метою оцінювання рівня значущості отриманих результатів використовували критерій Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Від клінічно здорових циплят-бройлерів 3-місячного віку, яких відгодовували в умовах птахофабрики, загальноприйнятими методами на збагачених простих середовищах з мікробіоти внутрішнього середовища циплят нами була ізолювана чиста культура індигенного нерезидентного пробіотичного аерококового мікробіонту. Для ідентифікації ізолюваного прокаріоту, за даними визначника Берджи, необхідно було сканувати кардинальні біологічні властивості.

У результаті проведених комплексних бактеріологічних досліджень зафіксували певні мікробіологічні характеристики ізолюваного пробіотичного прокаріота.

Морфо-тинкторіальні властивості. Аерококи представлені нерухомими кулястими Г+ клітинами діаметром 1,0–2,0 мкм, розташованими парами, тетрадами чи нерегулярними скупченнями, у мазках з культур, вирощених на рідких живильних середовищах – тетрадами.

Культуральні властивості. Аерококи виявилися факультативними анаеробами, які краще зростають в мікроаерофільних умовах,

утворювали дрібні колонії, викликаючи позеленіння 5%-вого кров'яного агару. За типом відношення до поживного субстрату їх віднесли до хемоорганотрофів з окисним метаболізмом; вуглеводи ферментували з утворенням кислоти, були каталазо-негативні чи злегка позитивні; желатин не розріджували; нітрати не відновлювали. Температурний оптимум 37–38 °С (також дають слабкий ріст при 10 °С, за температури 45 °С не зростають).

Встановили, що аерококи є сапрофітами, які широко розповсюджені в природі в біологічних субстратах, покровних тканинах макроорганізму. Методологія бактеріологічної ізоляції аерококів виявилась аналогічною індикації стрептококових інфекцій; ізолювані в такий спосіб аерококи утворювали білувато-сірі колонії, сформовані великими коками, зібраними в тетради чи пари. Подібно ентерококам, аерококи зростали на середовищах, що містять 6,5 % NaCl, але не росли за 45 °С, а також проявляли чутливість до бацитрацину.

На щільному живильному середовищі аерококи росли в S-формі, колонії мали вигляд круглих формувань розміром 1,0–2,0 мм у діаметрі, напівпрозорі, білі чи сірі, іноді бусинкоподібні. На 5%-вому кров'яному агарі колонії аерококів росли в M-формі й мали великі розміри та були оточені зоною позеленіння. У МПБ утворювали гомогенне помутніння, що мало тенденцію перетворюватися в зернистий осад, тобто S-форма культивування переходила у R-форму. На піку експоненціального росту аерокока накопичення бактеріальної культури в МПБ сягає $2,2\text{--}2,8 \times 10^9$ ж.м.к. за $P \leq 0,05$.

Біохімічні властивості. Визначено, що інтенсивність росту аерококів залежить від наявності в середовищі біотину, пантотенової і нікотинової кислот. Tween-80 заміняє потребу в біотині. Аерококи незалежні від вітамінів групи В: тіаміну, рибофлавіну, пиридоксину, фолієвої і флавонової кислот, але для росту аерококів потрібні екзогенні пурини. Гунін і ксантин взаємозамінні з аденіном. Бактерії не потребують екзогенних піримідинів. Потреба в амінокислотах варіабельна.

A. viridans у разі культивування в молоці з 1 % метиленової синьки не відновлює останньої, підкислював молоко за відсутності згортання, желатину не розріджував, аргінін, крохмаль, ескулін не гідролізував. Аерококи продукували кислоту, але не газ під час культивування на середовищах з глюкозою, мальтозою, лактозою, манітом, сахарозою. Ацетоїн не утворювали, рафінозу не зброджували, каталазу не продукували, коагулазу не утворювали.

Під час культивування в глюкозному 1%-вому бульоні кінцеве рН дорівнювало 5,1–5,8, ріст був мікроаерофільний. За аеробного росту штам починає продукувати перексид водню. Максимальна продукція перекису водню в культурі аерококів спостерігалася в ранній період логарифмічної фази росту. У аерококів – активних продуцентів перексиду водню – стаціонарна фаза розвитку культури є нетривалою. Аерококи проявляли високу чутливість до антибіотиків.

Окисдазну активність *A. viridans* визначали по здатності аерококів за свого росту окисляти калій йодид до йоду в складі щільного живильного середовища (МПА). Як індикатор до складу МПА вводили розчинний крохмаль. Після інкубації посівів за 37–38 °С протягом 48 год навколо штриха аерококів з'являлося темно-синє забарвлення, діаметр якого був не менш 10 мм.

Антагоністичну активність *A. viridans* перевіряли відносно тест-штамів методом штриха на МПА: штам проявив активну антагоністичну культуральну протидію до кишкової палички, сальмонели, вульгарного протей, золотистого стафілокока, пекарських дріжджів; не виявив антагоністичних потенцій за співкультивування зі синьогнійною паличкою і сапрофітною пліснявою.

A. viridans продукував ферменти, біологічно активні речовини, перексид водню, радикальний супероксид, короткі пептиди з антимікробною активністю.

A. viridans виявив потребу для росту в екзогенних пуринах, біотину, пантотеновій кислоті. Специфічні бактеріофаги не знайдені.

Біологічні властивості *A. viridans*. Штам не патогенний для сільськогосподарських, свійських і лабораторних тварин.

Антигенні та серологічні властивості A. viridans. Не вдалося отримати типових специфічних антисироваток. Аерокок, як аутогенний мікробіонт, формував зернистий осад у сольовому розчині чи бульоні. Кислотні і формамідні екстракти аерокока не давали преципітації з імуною сироваткою групи D стрептококів.

На підставі сканування кардинальних мікробіологічних характеристик рутинними методами бактеріологічного дослідження ізольованої пробіотичної культури за допомогою визначника Берджи встановили, що

представник нормальної мікробіоти 3-місячних курчат-бройлерів відноситься до виду *Aerococcus viridans*.

Після ізоляції та ідентифікації польова пробіотична культура *A. viridans* депонована як виробничий штаму VI-07. За комплексного вивчення кардинальних мікробіологічних характеристик ізольованої культури аерокока встановили, що *A. viridans* штаму VI-07 повністю відповідає видовим параметрам, володіє вираженими пробіотичними властивостями і може бути використаний для створення комплексного симбіотичного біопрепарату Субаерін.

Висновки

1. Індигенна пробіотична культура *A. viridans* штаму VI-07 – це грампозитивні дипло- і тетракоки, нерухомі, безкапсульні, факультативні анаероби, хемоорганотрофи з окисним метаболізмом, сапрофіти, нерезиденти покровних тканин тварин з високим колонізаційним потенціалом.

2. *A. viridans* штаму VI-07 володіє вираженими антагоністичними потенціями щодо

кишкової палички, сальмонели, вульгарного протей, золотистого стафілокока та дріжджів; не виявив антагоністичних потенцій за співкультивування зі синьогнійною паличкою і сапрофітною пліснявою.

3. *A. viridans* штаму VI-07 продукує ферменти, біологічно активні речовини, пероксид водню, радикальний супероксид, короткі пептиди з антимікробною активністю.

Бібліографія

- Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.]; за ред. В.В. Влізла. – Львів: СПОЛІОМ, 2012. – 764 с.
- Полтавська О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел: дис. ... канд. біол. наук / О.А. Полтавська. – К., 2016. – 132 с.
- Пробиотики і пребіотики [Електронний ресурс] / [F. Guarner, G. A. Khan, J. Garisch and др.] // World Gastroenterology Organisation. – 2008. – Режим доступу: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-russian-2008.hdf>.
- Сидоров М.А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М.А. Сидоров, В.В. Субботин, Н.В. Данилевская // Ветеринария. – 2000. – № 11. – С. 17–22.
- Шевелева М.А. Современные представления о применении различных групп пробиотических средств при антибиотикотерапии / М.А. Шевелева, Г.Р. Раменская // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. – Т. 54, № 3, 4. – С. 66–74.
- Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания

и восстановления / Д.С. Янковский. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.

7. Khan M. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens / M. Khan, D. Raoult, H. Richeta // British Poultry Science. – 2007. – № 48(6). – P. 732–735.

8. Probiotics supplementation during pregnancy or infancy for the prevention of atopic dermatitis: a meta-analysis / C. Pelucchi, L. Chatenoud, F. Turati [et al.] // Epidemiology. – 2012. – № 23(3). – P. 410–414.

9. Kovalenko N.K. Probiotic properties of industrial strains of lactobacilli and bifidobacteria / N.K. Kovalenko, O.P. Livins'ka, O.A. Poltav'ska // Mikrobiol. – 2010. – № 72(1). – P. 9–17.

10. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials / S. Sazawal, G. Hiremath, U. Dhingra [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2006. – № 6. – P. 374–382.

11. Vanbelle M. Probiotics in animal nutrition: a review / M. Vanbelle, E. Teller, M. Focant // Arch. Tierernahr. – 1990. – № 40(7). – P. 543–567.

12. Probiotics, immunity and exercise: a review / N.P. West, D.B. Pyne, J.M. Peake [et al.] // Exerc. Immunol. Rev. – 2009. – № 15(107). – P. 107–126.