

УДК: 619.579.22.546.21.636.5

МЕТОДИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ВИДІЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРОДУЦЕНТІВ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ У ПТИЦІ

І. А. Бібен

Дніпропетровський державний аграрний університет

*Із застосуванням селективно-індикаторних середовищ двох типів доведена наявність у мікрофлорі кишечнику курчат-бройлерів кросу «Кобб» аерококоподібних мікроорганізмів — грампозитивних, каталазо-негативних *A. viridans*.*

Методом відстроченого антагонізму встановлена антагоністична активність виділених коків до умовно-патогенної мікрофлори.

Постійний супутник організму здорової птиці — симбіотична мікрофлора — сукупність великої кількості мікробіоценозів, що характеризуються певним складом та займають ту чи іншу екологічну нішу в організмі [1].

Найважливішими представниками нормальної мікрофлори є різноманітні штами біфідо- і лактобактерій [2], пропіоново-кислих бактерій [3], непатогенні штами кишкової палички [4] і ентерококів, які забезпечують колонізаційну резистентність організму, є антагоністами умовно-патогенної мікрофлори, підтримують гомеостаз макроорганізму в необхідних межах [5].

У той же час у ссавців виявлені мікроорганізми роду *Aerococcus*, котрий, згідно з визначником Берджі, відноситься до групи, яка об'єднує аеробні та факультативно-анаеробні грампозитивні, каталазо-негативні коки.

Аерококи володіють значною антагоністичною активністю стосовно патогенних агентів, тому перспективною є розробка пробіотиків на основі цих мікроорганізмів [9].

Метою наших досліджень було виділення та ідентифікація з кишечника здорових курей мікроорганізмів роду *Aerococcus*, вивчення їх антагоністичних властивостей з метою подальшого конструювання пробіотика для потреб птахівництва.

Матеріали і методи. Дослідження проведені на базі віваріуму ветеринарної клініки Дніпропетровського державного аграрного університету, на курчатах-бройлерах кросу «Кобб» віком від 1 до 30 діб. Птицю утримували на стандартному раціоні. Під час досліду від здорових тварин відбирали екскременти, з яких ізолювали аерококоподібні мікроорганізми. Для виділення коків, що продукують активні форми кисню (АФК) та перевірки здатності виділення АФК чистими культурами, використовували селективно-індикаторні середовища двох типів: СІС-1 та СІС-2.

Склад середовищ: СІС-1 має у своєму складі (г на 1 л води): гідролізат кільки — 35,3; дріжджовий екстракт — 5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ — 0,25; KCl — 0,42; CaCl_2 — 0,5; MgSO_4 — 0,05; NaHCO_3 — 0,23; натрію хлорид — 5; крохмаль розчинний — 10; калію йодид — 1. Після вирощування мікроорганізмів поверхню чашки обробляли 10 % H_2SO_4 та враховували зони зміни зафарбовування [10]. Це середовище звичайно використовується для контролю продукції АФК мікроорганізмами.

СІС-2 складається з (г на 1л води): гідролізату кільки — 35,3; дріжджового екстракту — 5; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ — 0,25; KCl — 0,42; CaCl_2 — 0,5; MgSO_4 — 0,05; NaHCO_3 — 0,23; натрію хлориду — 5; крохмалю розчинного — 10; калію йодиду — 26. Виділення аерококів проводили на селективно-індикаторному середовищі СІС-2, що має у складі підвищену кількість калію йодиду (26 г/л). За цієї концентрації калію йодиду окислення KJ до J_2 проходить без участі H_2SO_4 , на відміну від СІС-1.

Ідентифікацію виділених коків продуцентів АФК, проводили згідно зі схемою (рис.1):

Для дослідження антагоністичної активності виділених коків по відношенню до виділеної умовно-патогенної мікрофлори, використовувався метод відстрочуваного антагонізму. Для порівняння користувались музейним штамом *A. viridans* 167 та виділеними курячими штамами продуцентів АФК, що були ідентифіковані як аерококи, штами 17, 43, 55. Вивчення проводили методом відстроченого антагонізму. Проводили посів штрихом 1 млрд/мл суспензії *A. viridans* посередині чашки МПА з 1 % глюкози та 0,4 мг/мл калію йодиду і інкубували посів при 37 °С 48 год. Після цього перпендикулярно до культури аерокока, яка виросла, робили підсів штрихом суспензій умовно-патогенних культур (5 одиниць стандарту ОСО 28-59-85) та інкубували при 37 °С 24 год. Зони затримки росту тест-культури заміряли від краю штриха до початку її росту.

Результати та обговорення. Всього було виділено 137 аерококоподібних мікроорганізмів від 27 особин птиці. При наступній ідентифікації за вищенаведеною схемою було встановлено, що 12 культур є істинними *A. viridans*. На рисунку 2 видно, що при розсіві розведень екскрементів птиці на середовищі СІС-2, серед безлічі безкольорових, наявний ріст зафарбованих колоній за рахунок відновлення молекулярного йоду з йодиду калію та його реакції з крохмалем.

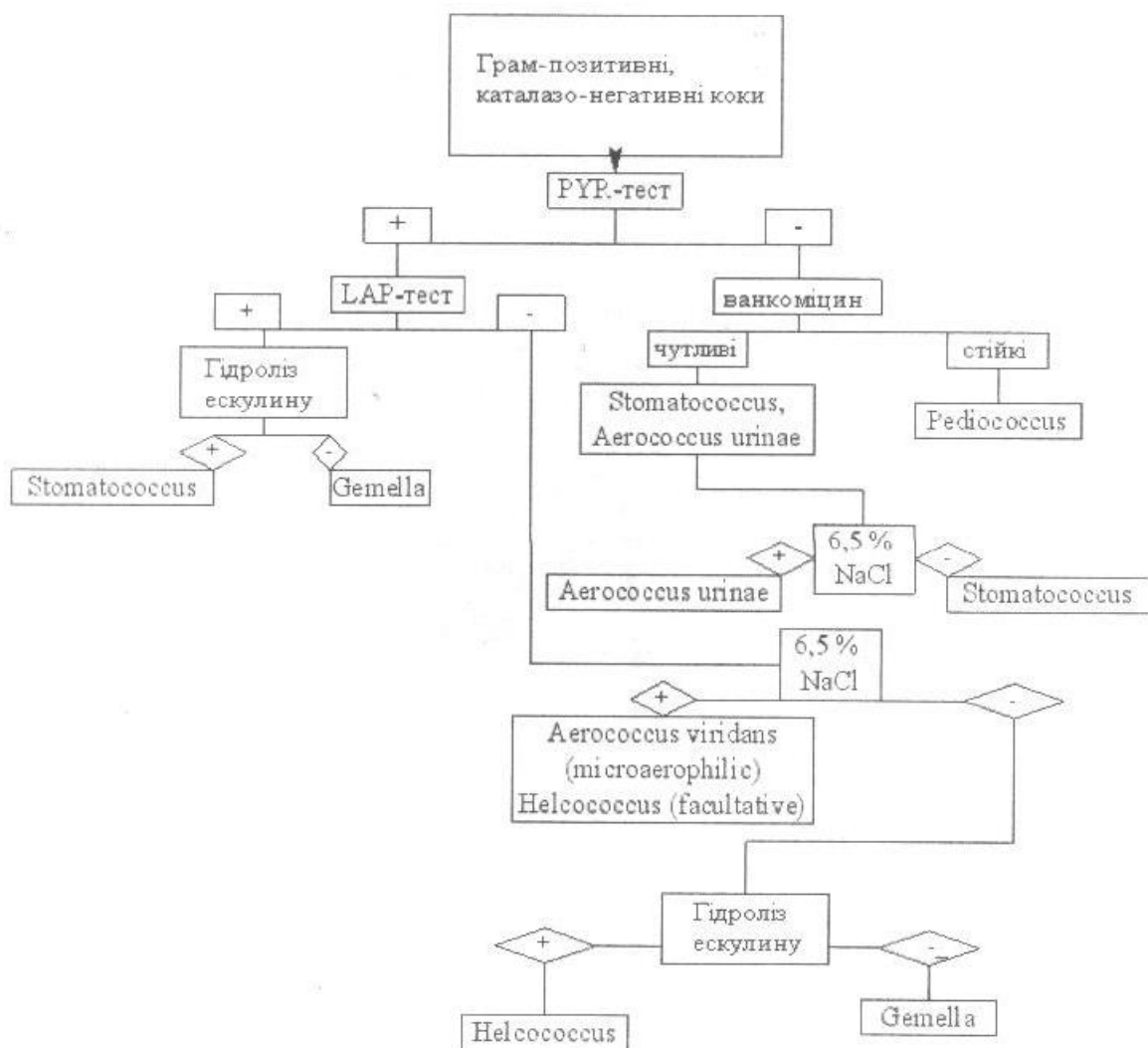


Рис. 1. Ідентифікація α -гемолітичних каталазо-негативних або слабо-каталазо-позитивних грампозитивних коків.

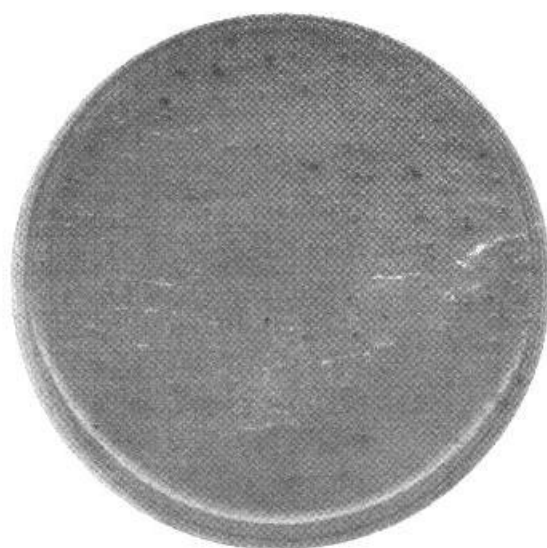


Рис. 2. Колонії продуцентів АФК, зафарбовані в темний колір при зростанні на середовищі СІС-2

Підозрілі колонії розсівались на середовище СІС-2 у вигляді газону для отримання більшої кількості фарбованих колоній, з котрих виділялись чисті культури продуцентів АФК. Контроль над продукцією АФК відібраними чистими культурами здійснювався на середовищі СІС-1 (рис. 2).

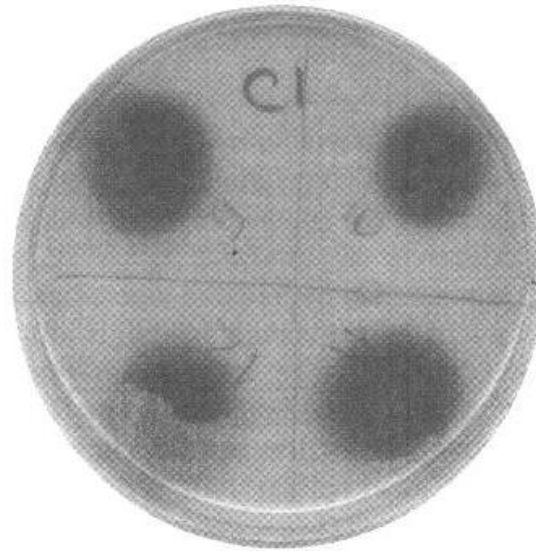


Рис. 3. Зони фарбування навколо пляшок росту аерококів після обробки поверхні агару СІС-1 сірчаною кислотою

На рисунку 3 видно зони реакції індикаторного середовища на виділення АФК пляшками чистих культур аерококів.

Була проведена перевірка антагоністичної активності виділених аерококів стосовно умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів (табл.).

Отримані результати, представлені в таблиці і на рисунку 4, дозволяють оцінити антагоністичну активність музейного та виділених штамів аерококів. Найбільш антагоністично активним проявив себе штам № 17.

Таблиця

Визначення антагоністичної дії музейного та виділених штамів *A. viridians* по відношенню до виявленої умовно-патогенної мікрофлори.

№ за/п	Види мікроорганізмів	Штами <i>A. viridians</i> (середнє значення зон затримки росту, мм)			
		167 (музейний)	17	43	55
1	<i>S. aureus</i>	11 ± 5	14 ± 2	12 ± 5	4 ± 2
2	<i>S. pyogenes</i>	13 ± 2	12 ± 3	0	2 ± 1
3	<i>S. pneumoniae</i>	10 ± 2	11 ± 0,7	0	0
4	<i>K. pneumoniae</i>	0	12 ± 2,1	4 ± 2	0
5	<i>K. oxytoca</i>	0	7,8 ± 0,9	0	0
6	<i>E. cloacae</i>	2 ± 1	4,3 ± 0,3	2 ± 1	0
7	<i>E. aerogenes</i>	0	2,0 ± 0,1	0	0
8	<i>P. aeruginosa</i>	0	10 ± 1,1	0	0

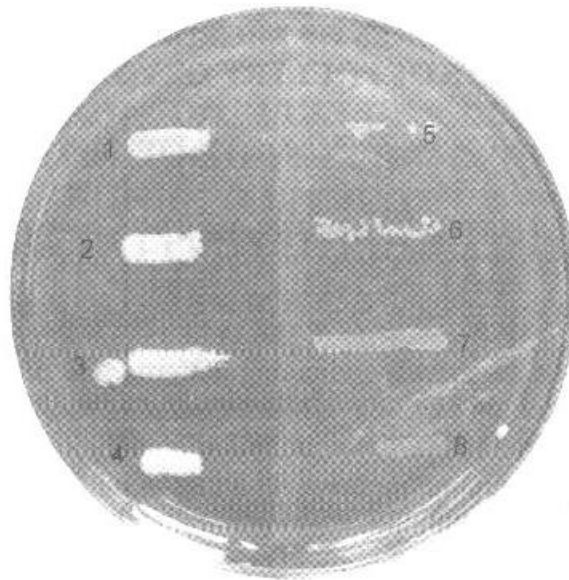


Рис. 4. Зони пригнічення росту тест-культур штамом аерококу № 17

ВИСНОВКИ

1. Доведена наявність продуцентів АФК в мікробіоценозі кишечника птиці.
2. Серед виділених штамів аерококоподібних мікроорганізмів ідентифіковані грам-позитивні, каталазо-негативні *A. viridans*.
3. Виявлено, що виділені грам-позитивні, каталазо-негативні штами *A. viridans* володіють вираженою антагоністичною активністю по відношенню до умовно-патогенних та патогенних бактерій, що дозволяє конструювати з них пробіотичні препарати.

Перспективи подальших досліджень. Планується конструювати пробіотичні препарати для потреб птахівництва на основі виділених штамів *A. viridians*.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОДУЦЕНТОВ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА У ПТИЦЫ

И. А. Бибен

Днепропетровский государственный аграрный университет

АННОТАЦИЯ

С применением селективно-индикаторных сред двух типов доказано наличие в микрофлоре кишечника цыплят-бройлеров кросса «Кобб» аерококкоподобных микроорганизмов — грамположительных, каталазо-отрицательных *A. viridans*. Методом отсроченного антагонизма установлена антагонистическая активность выделенных кокков к условно-патогенной микрофлоре.

METHODICAL FEATURES OF MICRO-ORGANISMS SELECTION OF PRODUCENTS OF POULTRY OXYGEN ACTIVE FORMS

I. A. Biben

Dnipropetrovsk State Agrarian University

SUMMARY

By using two types of selectively-indicating patterns was proved the presence in the microflora of gastrointestinal tract of chicken cross «Cobb» of aerococcus-like microorganisms — catalase-negative, gram-positive and *A. viridans*.

The method of the deferred antagonism set antagonism activity of the selected coccus to the conditionally-pathogenic micro-flora.

ЛІТЕРАТУРА

1. Брылин А. П. // Ветеринария. — 2006. — № 10. — С.16–17.
2. Бондаренков И., Воробьев А. А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2004. — № 1. — С. 84–92.
3. Сидоров М. А., Субботин В. В. // Ветеринария. — 2006. — № 11. — С. 17–21.
4. Субботин В. В., Сидоров М. А. // Ветеринария. — 2001. — № 4. — С. 3–7.
5. Семен І. С. Антагоністична активність лактобактерій, виділених з кишечнику здорових курей // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. 2008. — Вип. 9, № 1, 2. — С. 191–196.
6. Терехов О. П. // Иммунология. — 2005. — № 1. — С. 59–62.
7. Тихонов О.П. // Иммунология. — 2005. — № 1. — С. 59–62.
8. Тихонов И. В., Васильев П. Г., Грязнев А. М. // Ветеринарная медицина. — 2005. — № 1. — С. 3–4.
9. Кременчуцкий Г. Н., Рыженко С. А., Вальчук С. И. // Роль микрoэкологии организма человека и принципы её коррекции. — Днепропетровск. — 2003. — С. 129–174.
10. Патент на винахід. Живильне середовище для виділення та ідентифікації мікроорганізмів / Г. М. Кременчуцький — 15.01.2003. Бюл. № 1.

Рецензент — кандидат сільськогосподарських наук І. М. Кушнір, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.