

ІМУНОРЕАКТИВНІСТЬ КРОЛИКІВ ЗА ВВЕДЕННЯ КУЛЬТУРИ AEROCOCCUS VIRIDANS ШТАМ ВІ-22 ІЗОЛЬОВАНОЇ З МОЛОКА КОРОВИ

Бібен І.А. канд. вет. наук, доцент bibenvet@ukr.net
Сосницький О.І. докт.вет.наук, професор saidgaeus@gmail.com
Зажарський В.В. канд. вет. наук, доцент zazharskiyv@gmail.com
Усеєва Н.Г., старший викладач n0973640050@gmail.com

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпро

При проведенні загального бактеріологічного дослідження мікрофлори молока корів на індикаторних середовищах ізолювали індигенну культуру Aerococcus viridans штаму ВІ-22 і вивчили її морфо-тинкторіальні, культуральні, ферментативні і біологічні властивості. Ізолювана культура пробіотика володіла типовими базисними властивостями, була апатогенною, антибіотикочутливою і добре приживалась в кишковикі макроорганізму. За перорального застосування індигенна культура Aerococcus viridans штаму ВІ-22 викликала підвищення протективної здібності неспецифічної імунореактивності організму кроликів.

Ключові слова: імунореактивність, кролики, Aerococcus viridans, пробіотик, молоко корови.

Вступ. Сільськогосподарські тварини знаходяться в стані перманентного фізіологічного стресу, на межі адаптаційно-протективних можливостей інтегральних і життєвозабезпечуючих систем макроорганізму, тому що основна мета їх утримання – це одержання найбільшого економічного прибутку у вигляді тваринницької продукції, тобто їх організм піддається максимальній продуктивній експлуатації у відповідних технологічних умовах. Покращення умов утримання і добробуту, доведення їх до створення фізіологічного оптимуму адекватного запиту макроорганізму, складна і багатогранна біотехнологічна задача, яка вирішується різноманітними способами, одним з яких є використання індигенних пробіотичних прокаріот для корекції мікробіоти товстого кишкового і макроорганізму в цілому [1,2].

В гуманній і ветеринарній медицині здавна і досить широко використовуються пробіотичні мікроорганізми, як у вигляді фармацевтичних засобів, так і в якості різноманітних кисломолочних і продуктів консервованих на підставі зброджувальних процесів. Найбільш поширені кисломолочні продукти та пробіотики, які використовуються для їх виробництва. Але видове різноманіття

мікробіоти здорового організму включає велику кількість варіантів прокаріот, одним з яких є *Aerococcus viridans*. Аерококи дуже поширені у живій природі, є облигатними представниками нормальної мікрофлори теплокровних і холоднокровних тварин, в яких виконують важливі метаболічні функції і є показником фізіологічного благополуччя макроорганізму, тому що при дегенеративно-некротичних і хронічних запальних процесах вони елімінуються з внутрішнього середовища, і для відновлення фізіологічних функцій ураженого органу або тканини, потрібно штучно їх вводити в організм як лікарську пробіотичну добавку [3,4].

A. viridans – це індигенний резидентний представник мікробіоти макроорганізму ссавців і птиці, за умов фізіологічної норми функціонування органів і систем і виконує нагальні функції стабілізації і регулювання фізіологічних відправлень і загального метаболізму, конкурентної колонізації покривних тканин по відношенню до умовно-патогенної транзитornoї мікрофлори та детоксикації ксенобіотиків та токсинів ендогенного походження. Антагоністичні потенції обумовлені продукцією пероксида водню і супероксидного радикалу за рахунок функціонування NAD-незалежної лактатоксидази і піруватоксидази. Лабільна кількість аерококів, їх залежність від порушень фізіологічного стану макроорганізму різноманітного походження потребує перманентного додавання аерококового пробіотика до раціону тварин, а також і людини, для корекції і підтримання кількісного і якісного складу мікробіоти в межах фізіологічної норми, порушення якої веде к розвитку патофізіологічних змін і дізбіозу [4].

A. viridans як індигенний резидентний прокаріот з вираженими пробіотичними потенціями клінічно здорового макроорганізму завжди присутній в молоці корів, що є показником його біобезпечності і фізіологічної якості. Ізоляція аерококу з біологічно якісного і безпечного молока є оптимальним способом отримання нативного пробіотика для корекції мікробіоти макроорганізму [5]. При цьому важливо враховувати фізіологічні зміни, які індукує ендогенний розвиток аерококу у внутрішньому середовищі макроорганізму, в тому числі з боку імунної системи як інтегрального органу контролю генетичного гомеостазу і індивідуальності.

Мета досліджень. Ізоляція польової культури *A. viridans* і вивчення гуморальних механізмів неспецифічної резистентності і імунокомпетентних клітинних факторів реагування лімфоїдної системи макроорганізму на біомоделі організму кролика за перорального застосування індигенного пробіотика.

Матеріали і методи досліджень. Лабораторні дослідження виконували в науково-практичній лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин ФВМ ДДАЕУ.

Молоко для ізоляції *A. viridans* придбали на стихійному ринку. Аерококи виділяли на елективно-селективному щільному середовищі – МПА з додаванням

10 г розчинного крохмалю і 30 г кристалевого КІ на 1 л середовища. Стерилізували автоклавуванням за 1,5 атм 30 хв. Посіви з молока витримували за 37-38 °С впродовж 3-4 діб. Індикацію пробіотика проводили додаванням на поверхню бактеріального газону в чашках Петрі 10 % сірчаної кислоти. Колонії, які приймали темно-фіолетовий колір (внаслідок окислення КІ до I₂), вивчали мікроскопічно за фарбуванням за Грамом. При знаходженні типових прокаріот, робили відвивку на МПА чистої культури аерококів. Ізольовану з молока корови культуру *A. viridans* підтримували пересівами на МПА і МПБ з інтервалом 2 тижня. Для збереження культури на більш довгий термін добову бульонну розплідку аерококів вносили в ПЖА і зберігали за 4-6 °С до півроку. Потім освіжали пересівом на звичайні середовища.

Ферментативні властивості ізольованого штаму вивчали за загальними методиками при культивуванні на середовищах з вуглеводами, індикаторними барвниками і азотвмісними речовинами, антибіотикочутливість – методом дисків.

Біологічні властивості аерококів перевіряли при зараженні 1,0 см³ добової бульонної культури по 4 лабораторних тварини: білих мишей, живою масою 18-20 г; мурчаків – живою масою 250-300 г; кроликів сірого кольору – живою масою 2,0-2,5 кг і курчат білої яйценокської породи – 90-120 діб. Білих мишей і мурчаків інфікували підшкірно, кроликів і курчат – внутрішньом'язево. Спостерігали за дослідними тваринами впродовж 2 тижнів.

Імунобіологічний вплив польового пробіотика вивчали на кроликах за показниками неспецифічної резистентності макроорганізму, а саме: визначали показники фагоцитозу – фагоцитарний індекс (ФІ), що характеризує кількість захоплених мікроорганізмів одним активним фагоцитом (нейтрофілом) і фагоцитарне число (ФЧ), що вказує на кількість фагоцитованих мікробних клітин на 100 підрахованих лейкоцитів та гуморальні фактори – лізоцимну активність (ЛА), бактерицидну активність сироватки крові (БАСК) [1]. Сформували дві групи кроликів дослідну і контрольну живою масою 2,0-2,5 кг сірого кольору, по 4 голови. Кроликам дослідної групи задавали рег ос добову бульонну культуру аерококу в дозі 1,0 см³ впродовж місяця. Через 2 і 4 тижня відбирали кров і досліджували показники неспецифічної резистентності клітинного і гуморального ланцюгів реагування.

Цифрові дані дослідів опрацьовували статистично з використання t критерію Ст'юдента.

Результати дослідження. Польова культура *A. viridans* штам BI-22, яка була ізольована нами з молока корови, володіла типовими видовими властивостями, притаманних цьому прокаріоту. Аерококи були представлені грампозитивними моно-, діпло- і тетракоками, які викликали темно-фіолетове забарвлення, навкруги колоній, при культивуванні на індикаторному МПА з КІ і зону позеленіння (alpha-гемоліз) – на кров'яному агарі.

Культура *A. viridans* була швидкозростаючою, мезофільною, мікроаерофільною і давала слабкий ріст прокаріот в S-формі на звичайних середовищах за 37-38 °С. Температурний оптимум складав 36 ± 1 °С, також повільно і скудно росли при 10 °С, але не при 45 °С.

В МПБ через добу з'являлось гомогенне помутніння (опалесценція) і незначний зернистий осад, на МПА – маленькі сіро-білі ізольовані колонії, на кров'яному МПА – колонії більш масивні, оточені зоною позеленіння з переходом у бурий відтінок, повної прозорості не наступало.

A. viridans – хемоорганотрофи з окисним типом метаболізму; вуглеводи ферментували з утворенням кислоти без газу при культивуванні на середовищах з глюкозою, мальтозою, лактозою, манітом, сахарозою; рафінозу, аргінін, крохмаль, ескулін не гідролізували; каталазо-негативні чи незначно-позитивні; желатин не розріджували; нітрати не відновлювали; ацетоін і коагулазу не утворювали; при культивуванні в молоці з 1 % метиленової синьки, не відновлювали останньої, підкислювали молоко при відсутності згортання;

При культивуванні в 1 % глюкозному МПБ – термінальне рН знижалося до 5,1-5,8 і ріст був мікроаерофільний, а за аеробних умов зростання штам продукував пероксид водню. Максимальна продукція перекису водню в культурі спостерігалась у ранній період логарифмічної фази росту, стаціонарна фаза – нетривала. Аерококи проявляють високу чутливість до антибіотиків.

Ізольована культура *A. viridans* штам BI-22 проявляла високу чутливість до антибіотиків.

В біопробі на білих мишах, мурчаках, кроликах і курчатах аерококи були апатогенні. Після закінчення терміну спостереження з кишковика дослідних тварин вдалось ізольовати вихідну культуру.

При вивченні динаміки показників неспецифічної резистентності встановили, що пероальне застосування аерококу позитивно впливало на імунобіологічний статус макроорганізму і мало стимулюючий ефект на функціональну активність клітинної ланки імунного захисту. Так, в контролі ФА (%) дорівнював $39,4 \pm 0,12$ і $40,1 \pm 0,12$; ФІ (од.) – $6,9 \pm 0,21$ і $7,33 \pm 0,18$. У дослідних кролів ці показники встановили $38,8 \pm 0,14$ і $44,1 \pm 0,18$; ФІ (од.) – $6,7 \pm 0,22$ і $8,23 \pm 0,22$ з вірогідністю різниці $p \leq 0,05$.

Відомо, що найбільш фізіологічно активними у фагоцитарній активності є нейтрофільні гранулоцити, в першу чергу їх сегментоядерні форми, які формують першу лінію неспецифічного захисту і дуже чутливі до змін гомеостазу і кількісного і якісного складу мікробіоти макроорганізму. Тому згодовування індигенних прокаріот є фізіологічним стимулом фагоцитарної реакції імунореактивної системи як інтегрального органу, який забезпечує стан постійного гомеостазу внутрішнього середовища макроорганізму.

При дослідженні гуморальних факторів неспецифічної резистентності встановили, що у кролів контрольної групи ЛА (%) $47,7 \pm 1,65$ і $47,4 \pm 1,55$; БАСК

(%) $46,2 \pm 0,89$ і $46,88 \pm 1,23$. У дослідних кроликів ці показники були відповідно ЛА (%) $47,6 \pm 1,55$ і $49,7 \pm 1,66$; БАСК (%) $46,8 \pm 0,89$ і $54,67 \pm 1,67$ з вірогідністю різниці $p \leq 0,05$. Показники гуморального ланцюга неспецифічної резистентності достовірно зростають, що свідчить про більш велику потенційну можливість протективних механізмів гуморальних факторів імунореактивності.

Висновки.

1. Індигенна культура *A. viridans* штам *BI-22* ізольована з молока корови володіє типовими видовими властивостями, є апатогенною для лабораторних тварин, добре приживається у кишковику за перорального введення і виділяється з макроорганізму впродовж 4 тижнів (термін спостереження).

2. Пероральне застосування індигенної культури *A. viridans* штам *BI-22* викликає статистично достовірне підвищення показників клітинного і гуморального ланцюгів неспецифічної імунореактивності макроорганізму на біомоделі організму кроликів.

Список використаних джерел

1. Бибен И.А., Сосницкий А.И., Захарский В.В. Биологическая роль *Aerococcus viridans* в биотопе – ротовая полость поросят. Проблемы зооинженерии та ветеринарной медицины: Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії. – Х.: РВВ ХДЗВА, 2017. – Випуск 34, ч. 2 «Ветеринарні науки». – С. 233 – 237.

2. Бибен И.А., Сосницкий О.И., Захарский В.В. (2021). Субаерін Симбіотик, склад, біологічні властивості, дія на макроорганізм. Науково-технічний вісник Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок та Інститут біології тварин, 22(2), 55–65. doi: 10.36359 / scivp.2021-22-2.06

3. Gotsulya A., Zazharskyi V., Parchenko V., Davydenko P., Kulishenko O., Brytanova T. (2022). N'-(2-(5-((theophylline-7-yl)methyl)-4-ethyl-1,2,4-triazole-3-ylthio)acetyl)isonicotinohydrazide as antitubercular agents, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Volume 42 / Number 3 / September 2022 / pp. 149-155 doi.org/10.52794/hujpharm.1011368

4. Tkachenko, A., Davydenko, P., Zazharskiy, V., Brygadyrenko, V. Biological properties of dissociative L- and other forms of *Mycobacterium bovis*. Biosystems Diversity [Internet]. 2016 Aug 27;24(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.15421/011644>

5. Чумаченко В.Ю. Резистентність тварин і фактори, що впливають на її стан. Дослідження імунної системи. Фактори, що впливають на резистентність тварин / В.Ю. Чумаченко, В.В. Чумаченко, О.А. Павленко // Ветеринарна медицина У