

УДК: 636.087.7-048.24

Кучерук М.Д.

*доктор ветеринарних наук, доцент кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»*

Кам'янець-Подільський, Україна

e-mail: kucheruk.md@gmail.com

[ORCID: 0000-0002-8048-533X](https://orcid.org/0000-0002-8048-533X)

Токарчук Т.С.

*кандидат сільськогосподарських наук, доцент,
асистент кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної
служби Національної поліції України*

Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»

Кам'янець-Подільський, Україна

E-mail: ttocarchuk@gmail.com

ORCID: 0000-0001-6030-0572

Трач В.В.

*кандидат ветеринарних наук, асистент кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»*

Кам'янець-Подільський, Україна

E-mail: slavko2205@gmail.com

ORCID: 0000-0002-1040-3327

ДОКЛІНІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ ПРОФІЛАКТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ПОСТБІОТИКУ

Анотація. У статті наведено проведені лабораторні та доклінічні дослідження розробленого нами мікробіологічного препарату. Визначено його антибактеріальні властивості за різних концентрацій бактеріоцину нізину. У якості тест культур в лабораторних дослідженнях антимікробної активності використовували різні концентрації таких штамів мікроорганізмів як *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii*, *Yersinia enterocolitica*.

Механізм біологічної дії бактеріоцинів пов'язаний, насамперед, із порушенням цитоплазматичних мембран чутливих до них мікроорганізмів. Бактеріоцини на відміну від антибіотиків, що діють досить вибірково, впливають і на резистентні до антибіотиків штами мікроорганізмів, повністю розщеплюються і виводяться з організму. Бактеріоцин нізин продукується штамом мікроорганізмів *Lactococcus lactis*, володіє антибактеріальними

властивостями проти широкого спектру патогенних мікроорганізмів, використовується в якості консерванту в харчовій промисловості. Молочна кислота за застосування всередину володіє протибродильною, антисептичною, подразнюючою дією. Пригнічує ріст і розвиток умовно патогенної і гнильної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, стимулює процес відновлення кишкових ворсинок, що збільшує поверхню всмоктування поживних речовин. Випробування другого дослідного зразку на мишах показало, що препарат не спричиняв місцево-подразнюючої, шкірно-резорбтивної та сенсibiliзуючої дії, не викликав клінічних змін та порушень в роботі систем органів мишей. Розроблений і випробуваний препарат є перспективним для здійснення корекції ендомікрофлори травного каналу тварин, в тому числі за органічного вирощування, найбільш перспективними, на нашу думку, є саме препарати мікробіологічного походження.

Ключові слова: *антибактеріальна дія, доклінічні випробування, нешкідливість, пробіотик, постбіотик, профілактичний препарат, тести на мікроорганізми.*

Мета роботи. Науковий інтерес становило поєднання двох компонентів, найбільш вагомих метаболітів лактобактерій: бактеріюцина нізину, так і молочної кислоти для відтворення складу постбіотику в найпростішій його варіації. Водночас метаболітами симбіотичних мікроорганізмів є також незамінні амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни С, Е, РР, Н і групи В. Що буде враховано за подальшого вдосконалення складу постбіотику. Дозування нізина в харчовій промисловості становить 50-150 г/тонну продукції. Подальші дослідження планується спрямувати на вдосконалення його складу завдяки введенню нових компонентів.

Виклад основного матеріалу дослідження.

Вже досить давно у науці і практиці ветеринарної медицини використовуються мікробіологічні препарати – «пробіотики». До їх складу входять живі мікроорганізми похідні лактобацил і інших компонентів нормальної кишкової мікрофлори, що нормалізують склад та біологічну активність мікрофлори травного каналу. Виділяють пробіотики від здорових тварин із мікрофлори їхнього кишечника [1]. Термін “пробіотик” у західній медичній літературі все частіше визначається як “препарат мікробних клітин або їхніх компонентів із корисним впливом на здоров’я та самопочуття господаря”. Адже функціонування багатьох систем організму тварин значною мірою

залежить від видового складу та міжвидового співвідношення мікроорганізмів [2].

Феномен пробіозису визначається як асоціація двох організмів, яка стимулює життєві процеси кожного з них, а жива мікробна кормова добавка, яка корисно діє на тварину-господаря через поліпшення його кишкового мікробного балансу, дістала назву пробіотика [3].

Ці препарати застосовують із водою або кормом. Найчастіше, як пробіотичний штам використовують біфідобактерії й молочнокислі бактерії, зокрема лактобацили. Ці пробіотики називають класичними, оскільки вони засновані на штаммах, що домінують у різних біотопах людини і тварин, починаючи з перших днів життя [4].

Однак, науковці під час аналізу основних причини, що негативно впливають на якість пробіотиків, виокремили такі: контамінація сторонньою мікрофлорою; заміна одного пробіотичного штаму іншим; недотримання показника кількості життєздатних клітин в одній дозі препарату; недосконалість методів контролю якості; введення в препарат різних добавок, що інактивують його; недотримання режимів зберігання. Досить часто пробіотики, що пройшли успішні лабораторні дослідження, не витримують випробування у виробничих умовах, оскільки нехтування санітарно-гігієнічними заходами на фермі призводить до створення антисанітарних умов у пташниках. Відсутність санітарних днів на фермі, не функціонування дезбар'єрів та дезкилимків, не вчасне прибирання, неякісне проведення дезінфекції (без взяття контрольних змивів із поверхонь), нехтування персоналом правилами особистої гігієни та якісною очисткою інвентарю, а також багато інших чинників, що створюють умови підвищеного мікробного забруднення [5].

В останнє десятиріччя концепція пробіотиків зазнала суттєвих змін, окремо виділяється група, що містять продукти метаболізму або структурні компоненти пробіотичних мікроорганізмів. Такі зміни пов'язані з розширенням уявлень про біологічну ефективність пробіотиків і виявленні того факту, що

структурні елементи клітин та їхні метаболіти в низці випадків виявляються не менш, а навіть більш ефективними.

Метабіотики (постбіотики) є структурними компонентами пробіотичних мікроорганізмів і / або їх метаболітів, і / або сигнальних молекул із певною (відомою) хімічною структурою, які здатні оптимізувати специфічні для організму господаря фізіологічні функції, регуляторні, метаболічні та / або поведінкові реакції, пов'язані з діяльністю індигенної мікробіоти організму-господаря. Застосування постбіотиків (метабіотиків) дає змогу створити керований мікробіоценоз кишечника, оскільки метаболічні, сигнальні, транспортні та інші функції представників індигенної мікробіоти мають більше значення, ніж кількісний вміст у біотопі мікроорганізмів тих або інших видів [6].

Як клас метабіотики виділені в практичних рекомендаціях Всесвітньої гастроентерологічної організації, у визначеннях Експертного комітету ФАО і ВООЗ ще у 2008 році.

Постбіотики сприяють відновленню мікробіоценозу в кишечнику тварин та гармонізують біологічні функції організму господаря. До їхнього складу може входити від 2 до 100 біологічно активних речовин. За кордоном уже є запатентована нова технологія, здатна моделювати тип метаболітів, що утворюються під час бактеріальної ферментації. Ці метаболіти мають виразні імуномодулюючі властивості. Вони здатні моделювати імунну відповідь організму [7]. Лактобацили, біфідобактерії та інші бактерії як в умовах *in vitro*, так і у тваринному організмі продукували різноманітні антимікробні сполуки (органічні кислоти, бактеріоцини, мікроцини, бактеріоцін-схожі антибіотики, дефензін-схожі пептиди, ензими з антимікробними ефектами (лізоцим), діацетил, антибіотики, перекис водню, оксид азоту, діоксид вуглецю, біосурфактани, лектини тощо) щодо широкого кола грамнегативних і грампозитивних бактерій.

Детальне вивчення властивостей метабіотиків (постбіотиків) Шендеровим Б.А. (2001) дало можливість впровадити в практику гуманної медицини, зокрема, у вигляді препаратів на основі їхніх активних компонентів:

- нізин, стафілококцин, томіцид (антимікробні препарати бактеріцинового типу);
- хілак-форте (суміш ЛЖК, молочної кислоти, деяких вітамінів та інших мікробних продуктів кишкових паличок, стрептококів і лактобацил);
- бактистатін (суміш мікробних протеаз, амілаз, лізоциму, каталази, поліпептидів, пептидоглікана, деяких амінокислот, полісахаридів, присутніх у культуральній рідині *Bacillus subtilis*, що не містять живі бактерії + сорбент цеоліт);
- хелінорм (інактивовані клітини пробіотичних бактерій *Lactobacillus reuteri*, можуть специфічно зв'язуватися і виводити *Helicobacter pylori* природним шляхом);
- актофлор С (ауторегулятор зростання й розвитку еукаріотичних із прокаріотичних клітин на основі ацетату, лактату, сукцината, форміату, лізину, глутамінової та аспарагінової кислот, валіну, метіоніну, аланіну, лейцину, гліцину);
- дайго (Daigo) – (суміш пептидів – біорегуляторів, ізольованих із культуральних рідин 16 штамів лактобацил (*L.curvatus*, *L.casei*, *L.acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L.salivarius*, *L.brevis*, *L.rhamnosus*), вирощених протягом року на соєвому молоці;
- закофальк (комбінація бутирата натрію й інуліну) [8].

Найбільш вивченими та високоефективними з них є бактеріюцини та органічні кислоти.

Бактеріюцини (Bacteriocins). Бактеріюцини є представниками метаболітів симбіотичних бактерій, що виконують бактерицидну функцію в кишечнику. Багато представників грамнегативних і грампозитивних бактерій продукують бактеріюцини, що мають білкову природу. Їхня генетична інформація кодується на плазмідах. Одні згубно діють на споріднені види бактерій і штами того ж виду, або гальмують їхній ріст, інші мають більш широкий спектр антибактеріальної дії. Бактеріюцини здатні вироблятися представниками роду *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, сімейства *Enterobacteriaceae*. Ці антимікробні білки

продукуються також грамнегативними бактеріями таких родин, як *Pseudomonadaceae*, *Neisseriaceae* [9].

Велике число бактеріоцинів виробляється грампозитивними бактеріями. (особливо лактобактеріями). Продуковані ними бактеріоцини, за механізмом їхньої антибактеріальної дії, поділяють на дві групи. Представники першої групи характеризуються вузьким спектром антибактеріальної дії, вони пригнічують розвиток бактерій, близьких до організму-продуцента [**Помилка! Джерело посилання не знайдено.**]. У цю групу входять такі бактеріоцини: лактоцин S (утворений *Lactobacillus sake*), аміловорін (*L. amylovorus*) та ін. До другої групи належать антибіотики, що інгібують ріст багатьох видів грампозитивних мікроорганізмів. Сюди належать такі бактеріоцини, як ацидоцин В (утворений *L. acidophilus*), курвацин (*L. curvatus*), лактицин (*Lactococcus lactis*) тощо [9].

Механізм біологічної дії бактеріоцинів пов'язаний, насамперед, із порушенням цитоплазматичних мембран чутливих до них мікроорганізмів. Бактеріоцини на відміну від антибіотиків, що діють досить вибірково, впливають і на резистентні до антибіотиків штами мікроорганізмів, повністю розщеплюються і виводяться з організму. Імовірність накопичення та виникнення ускладнень від бактеріоцинів, мінімальна. Застосування ж антибіотиків, на жаль, нерідко загрожує людині і тваринам негативними наслідками. Як антимікробний засіб ця сполука надійшла на комерційний ринок в Англії в 1953 році. У 1969 році нізін як безпечна харчова добавка був схвалений спільно ФАО і ВООЗ. У даний час нізін ліцензований у понад 50 країнах, де використовується в харчовій промисловості як природний біоконсервант для різних продуктів. Наприклад, в 1988 році Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів (Food and Drug Administration) США затвердив статус нізину як «загальновизнаний безпечним» (generally regarded as safe). Водночас можливість його використання в медицині стала інтенсивно досліджуватися тільки в останні роки.

Біфідобактерії здатні виділяти бактеріоцини (біфідин та біфілонг), які проявляють антимікробну активність щодо багатьох видів ентеробактерій,

вібріонів, стрептококів та стафілококів [8]. Лактобактерії беруть участь у гідролізі вуглеводів, продукують лізоцим, лактоцидин, ацидофілін, перекиси, антибіотики та бактеріоцини; пригнічують розвиток синьогнійної палички, стафілококів, ешеріхій, протею, деяких видів шигел, серацій, сальмонел, стрептококів [Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

З молочнокислих бактерій виділено кілька бактеріоцинів, які є лантибіотиками. Лантибіотики – це бактеріальні поліпептиди, до складу яких входять такі рідкісні тіоефірні амінокислоти. Ці речовини мають широкий антимікробний спектр дії [Помилка! Джерело посилання не знайдено.]. Бактеріоцин нізин продукується штамом мікроорганізмів *Lactococcus lactis*, володіє антибактеріальними властивостями проти широкого спектру патогенних мікроорганізмів, використовується в якості консерванту в харчовій промисловості [8, 9]. До складу його входять амінокислоти лізин, гістидин, аспарагінова кислота, лантйонін, В-метиллантйонін, пролін, гліцин, аланін, валін, метйонін, ізолейцин, лейцин, дигідроаланін і В-метилдигідроаланін.

Іншими метаболітами, що допомагають організму боротися з патогенною мікрофлорою в просвіті травного каналу є органічні кислоти, зокрема, оцтова, бурштинова, молочна, за які згадувалося раніше [5].

Молочна кислота за застосування всередину володіє протибродильною, антисептичною, подразнюючою дією. Пригнічує ріст і розвиток умовно патогенної і гнильної мікрофлори шлунково-кишкового тракту, стимулює процес відновлення кишкових ворсинок, що збільшує поверхню всмоктування поживних речовин [10].

Молочна кислота в складі корму, абсолютно безпечна та повністю засвоюється в результаті обміну речовин, до того ж вона включається в процес метаболізму у вигляді додаткової обмінної енергії. А також для підвищення продуктивних якостей птиці в раціон додають молочну кислоту 40 % у дозі 0,5 мл на 1 кг корму (500 мл молочної кислоти 40 % на 1 тону корму). Доцільно використовувати її для поточної дезінфекції пташників, інкубаторів тощо.

Отже постбіотики володіють такими перевагами порівняно з пробіотиками:

- висока біодоступність, метабіотичні речовини доходять до товстої кишки на 95-97% в незмінному вигляді (у пробіотиків – менше 0,0001 %);
- не вступають у конфлікт (антагоністичні взаємини) з власною мікробіотою організму тварин, на відміну від пробіотичних бактерій;
- перебувають в активній формі та починають працювати відразу, потрапляючи в травний канал;
- можливе спрямоване коригування мікробіоценозу кишечника створенням запрограмованого метабіотичного препарату залежно від типу порушення мікробіоценозу кишечника й особливостей життєдіяльності конкретних патогенних або умовно патогенних штамів мікроорганізмів кишечника.

Визначення антимікробної активності препарату проводили за допомогою методу дифузії в агар розчинів. Порівнювали розміри зон пригнічення росту тест-мікроорганізмів. Наявність зон затримки росту тест-штаму навколо луночки з антимікробним препаратом і її розмір є показником чутливості цього мікроорганізму до антибіотика. Відсутність зони затримки росту свідчить про стійкість мікроорганізму до досліджуваного препарату. В якості поживного середовища використовували середовище Мюллера-Хінтона [Помилка! Джерело посилання не знайдено.].

Для підготовки досліду добові культури тест-мікроорганізмів змивали з поверхні МПА фізіологічним розчином NaCl і доводили густину бактеріальної суспензії (інокулюму) до 10 млрд м.т./см³.

Поживний агар розтоплювали на водяній бані й охолоджували до температури 45 ± 5 °C. Стерильні чашки Петрі після підсушування розташовували на строго горизонтальній поверхні столу. В охолоджений агар додавали 1 см³ інокулюму. У кожную з чашок Петрі заливали по 10 см³ поживного агару і, обережно обертаючи, перемішували вміст чашки на поверхні столу, запобігаючи утворенню бульбашок повітря, неповному заповненню дна чашки агаром, потраплянню середовища на краї та кришку чашки. Чашки витримували

на горизонтальній поверхні до застигання середовища. У кожній із чашок в агарі вирізали стерильною металевою трубкою лунки діаметром 6 мм на відстані 2 см від краю чашки, було зроблено по 6 луночок (1 луночка відповідає 0,4 мкл речовини), на кожній було відмічено певну концентрацію постбіотика.

Випробовувалось два варіанти постбіотика (з різною концентрацією нізину):

Зразок 1 (0,05 г нізину, +10 мл 40 % молочної кислоти, +89,95 мл дистильованої води).

Зразок 2 (0,10 г нізину, 10 мл 40 % молочної кислоти, +89,90 мл дистильованої води).

Мікропіпеткою вносили постбіотик (0,4 мкл) заданої концентрації у відповідну луночку й залишали на 1,5 год на столі для дифундування.

Посіви інкубувалися за температури 36 ± 1 °C упродовж 24 ± 2 год. Чашки з посівами розташовували в термостаті у такий спосіб, щоби відстань між чашками та стінками термостату була не менше 3 см. Результат враховували через 24 години, визначаючи діаметр зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо лунки. За відсутності ознак затримки росту мікроорганізми вважали стійкими щодо досліджуваного препарату: в разі затримки росту до 15 мм – малочутливими; за затримки росту від 15 до 25 мм – чутливими. Експерименти *in vitro* проводили в трьох паралелях із кожною концентрацією препарату. Досліди супроводжували відповідними контролюми з внесенням стерильного фізіологічного розчину NaCl.

У якості тест-культур використали референтні штами мікроорганізмів, *Escherichia coli* ($4,3 \times 10^9$ КУО/см³), *Escherichia coli* ($4,3 \times 10^8$ КУО/см³), *Escherichia coli* ($4,3 \times 10^7$ КУО/см³), *Bacillus cereus* ($3,5 \times 10^9$ КУО/см³), *Bacillus cereus* ($3,5 \times 10^8$ КУО/см³), *Bacillus cereus* ($3,5 \times 10^7$ КУО/см³), *Staphylococcus aureus* ($5,5 \times 10^9$ КУО/см³), *Staphylococcus aureus* ($5,5 \times 10^8$ КУО/см³), *Staphylococcus aureus* ($5,5 \times 10^7$ КУО/см³), *Listeria ivanovii* (5×10^8 КУО/см³), *Yersinia enterocolitica* (9×10^8 КУО/см³).

Усі культури тест-мікроорганізмів зберігали в запаяних пробірках на відповідних поживних середовищах до 30 діб у холодильних камерах за температури 4-8 °С, після чого пересівалися на нові поживні середовища. Перед проведенням досліджень було проведено контроль чистоти росту культури стандартним методом.

Розробка технологічного регламенту виробництва постбіотику.

Оскільки розроблений постбіотик планувалося впроваджувати у виробництво на органічних фермах з вирощування птиці в технологічний процес виробництва постбіотику «Бактеріосан» входило:

Підготовка сировини:

- бактеріоцин нізин – дрібно дисперсний порошок жовтуватого кольору, гігроскопічний, легко розчинний у воді, стійкий до дії кислот, вміст води – менше ніж 3 % – відноситься до групи харчових добавок, консервантів антибіотичної природи (Е 234). За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи відповідає встановленим медичним критеріям безпеки.

- молочна кислота ($C_3H_6O_3$) – органічна кислота, харчова добавка (Е270), прозора рідина з жовтуватим відтінком, має приємний характерний кисломолочний запах і кислий смак, розчинна у воді, не каламутна і без осаду. Утворюється в живих організмах (тварини, рослини, мікроорганізми), а також виготовляється в мікробіологічній промисловості в результаті ферментативної реакції при молочнокислому бродінні глюкози.

1 - змішування допоміжних речовин із водою;

2 - контроль рН та стабільності розчинів;

3 - контроль якості: фізико-хімічні та мікробіологічні властивості.

Визначення зовнішнього вигляду, кольору. Зовнішній вигляд та колір готового розчину визначали візуально. Для цього в пробірку з безбарвного скла із внутрішнім діаметром 25-26 мм наливали розчин до половини і розглядали його за кімнатної температури в розсіяному природньому (штучному) освітленні. Даний засіб – прозора рідина світло-жовтого кольору.

Визначення масової частки молочної кислоти. Препарат об'ємом 20 мл зважують і результат записують із точністю до другого десяткового знака, кількісно переносять у мірну колбу місткістю 250 см³, доводять дистильованою водою до мітки та ретельно перемішують. Отриманий розчин об'ємом 25 см³, який містить 2 г препарату, піпеткою переносять у конічну колбу із шліфом місткістю 250 см³, додають від 70 см³ до 80 см³ дистильованої води і титрують за допомогою бюретки розчином гідроксиду натрію за наявності фенолфталеїну, який додають крапельницею до слабко-рожевого кольору, що свідчить про нейтралізацію розчину.

До нейтралізованого розчину додають розчин гідроксиду натрію об'ємом 20 см³, кип'ятять зі зворотним холодильником упродовж 5 хв, охолоджують, закривши пробкою з трубкою, заповненою натронним вапном, і вміст колби титрують розчином сірчаної кислоти до знебарвлення.

Паралельно проводять контрольне випробування. У конічну колбу із шліфом місткістю 250 см³ вносять 10 см³ розчину гідроксиду натрію, додають 90 см³ дистильованої води, кип'ятять зі зворотним холодильником упродовж 5 хв, охолоджують, закривши пробкою із трубкою, заповненою натронним вапном, і титрують розчином сірчаної кислоти за наявності фенолфталеїну до знебарвлення.

Обчислення результатів

Масову частку загальної молочної кислоти (X) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = (V1 - n \cdot V2) \cdot K \cdot 0,09 \cdot 100 \cdot V3 / V4 \cdot V1,$$

де V1 – об'єм розчину гідроксиду натрію, який додають до нейтралізованого розчину, см³;

n – відношення об'ємів гідроксиду натрію, взятого на контрольне визначання (10 см³), і сірчаної кислоти, витраченої на його титрування;

V2 – об'єм розчину сірчаної кислоти, витрачений на титрування надлишку гідроксиду натрію, см³;

K – коефіцієнт поправки розчину гідроксиду натрію;

0,09 – маса молочної кислоти, що відповідає 1 см³ розчину гідроксиду натрію, г;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки;

V3 – об'єм мірної колби, см³;

V4 – об'єм розчину, який містить 2 г препарату, см³.

Результати обчислення округлюють до другого десяткового знака.

За результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень.

Абсолютна похибка вимірювання масової частки загальної молочної кислоти становить $\pm 0,80$ % за довірчої ймовірності $P = 0,95$.

Засіб може мати масову частку молочної кислоти: $10,0 \pm 1,0$ %.

Визначення масової частки бактеріоцину нізину. Бактеріоцин нізин – порошкоподібна речовина блідо-жовтого кольору. Засіб може мати масову частку бактеріоцину нізину: $1,0 \pm 0,10$ %.

Визначення показника концентрації водневих іонів (рН). Показник концентрації водневих іонів рН вимірюють потенціометричним методом зі скляним електродом. Калібрування потенціометра проводиться за стандартними буферними розчинами з рН 4,01; 7,00; 9,21.

Визначення наявності сторонніх домішок проводять візуально на чорному та білому фонах за освітлення електричною лампою розжарювання або люмінесцентною лампою за вертикального положення пробірок. Пробірки, у яких проводять спостереження, повинні бути безбарвні й однакового діаметру. У засобі допускається незначна кількість осаду.

Контроль маркування та пакування проводять візуально згідно з використаною тарою.

Контроль об'єму проводять мірними флаконами. Допустиме відхилення не повинно перевищувати $\pm 3,0\%$. Контроль маси бруто проводять механічними або електронними вагами.

У такий спосіб створено композицію постбіотика «Бактеріосан», розроблено технологічний регламент його виробництва, методи контролю

якості. Зареєстровано ТУ України (№10.8-00493706-107. 2020. Технічні умови. Постбіотик «Бактеріосан» : Київ, 2020. 19 с.)

Дослідження фізико-хімічних та антимікробних властивостей постбіотика «Бактеріосан» *in vitro*

Досліджували ефективність постбіотику у двох варіантах із різною концентрацією діючої речовини щодо тест-штамів мікроорганізмів різних груп у різних концентраціях.

Таблиця 1.

Склад і фізичні властивості випробовуваних зразків пробіотику

Постбіотик	Нізін	Молочна кислота 40 %	Вода дистильована	pH	Колір
Зразок 1	0,05 г	10 мл	89,95 мл	4,3	Прозора рідина з жовтуватим відтінком
Зразок 2	0,10 г	10 мл	89,90 мл	4,3	Прозора рідина з жовтуватим відтінком

Ефективність препарату з різною концентрацією нізину визначали в нативному стані (робочий розчин) та в послідовних десятиразових розведеннях від 1 : 100 до 1 : 1000000 (табл. 2).

Результати досліджень показали ефективність нативних розчинів препарату щодо тест-культур, розведення препарату інгібуючої дії не проявляли. Спостерігали залежність протимікробної активності постбіотику від концентрації мікробних тіл в 1 см³ тест-культури: за поступового десятикратного зниження концентрації мікроорганізмів збільшувався діаметр інгібіції росту культур навколо аплікації препарату.

Таблиця 2.

Антимікробна активність випробовуваних препаратів щодо тест-культур мікроорганізмів, $M \pm m$, $n = 5$

Концентрація мікробних клітин, тест-культури мікроорганізмів	Випробовувані речовини				
	Зразок 1	Зразок 2	Молочна кислота 4 %	Нізин 0,1 г	Нізин 0,05 г
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^9$ КУО/см ³)	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^8$ КУО/см ³)	++	+++	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^7$ КУО/см ³)	+++	+++	++	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^9$ КУО/см ³)	+	+	+	++	-
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^8$ КУО/см ³)	+	++	++	++	+
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^7$ КУО/см ³)	+	+++	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^9$ КУО/см ³)	++	++	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^8$ КУО/см ³)	++	++	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^7$ КУО/см ³)	++	+++	++	++	-
<i>Listeria ivanovii</i> (5×10^8 КУО/см ³)	+++	+	+	++	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> (9×10^8 КУО/см ³)	+	+++	++	+	+

Позначення: «+» – діаметр зони затримки росту мікроорганізмів (зона дії антибактеріального препарату) від 10 до 15 мм (слабка антибактеріальна дія); «++» – діаметр зони пригнічення росту від 15 до 20 мм (помірно виражена антибактеріальна дія); «+++» – діаметр зони пригнічення росту понад 20 мм (сильно виражена антибактеріальна дія); «—» – діаметр зони затримки росту мікробів менше 10 мм, відсутність зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунок.

Діаметри інгібіції росту тест-культури *E. coli* за концентрації $4,3 \times 10^9$ КУО/см³ навколо зони аплікації зразку 1 становили 8 мм; за концентрації $4,3 \times 10^8$ КУО/см³ > 8-15 мм; за концентрації $4,3 \times 10^7$ КУО/см³ 15 мм.

У тест-культур *B. cereus* та *S. aureus* залежності між концентрацією посівної дози та активністю зразку 1 не спостерігали, діаметри інгібіції росту культур були стабільними. Діаметр інгібіції росту тест-культури *B. cereus* за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^9$, $3,5 \times 10^8$, $3,5 \times 10^7$ становили 12-15 мм., а *S. aureus* за вмісту КУО в 1 см^3 $5,5 \times 10^9$, $5,5 \times 10^8$, $5,5 \times 10^7$ – 18 мм. За дії зразку 1 на культуру мікроорганізмів *L. ivanovii* з концентрацією 5×10^8 КУО/см³, зона пригнічення становили 36 мм, тоді як за дії цього ж постбіотику на культуру мікроорганізмів *Y. enterocolitica* з концентрацією КУО 9×10^8 в 1 см^3 – лише 13 мм.

За випробування зразку 2 реєстрували подібні результати щодо тест-культур: ефективним виявився нативний зразок препарату (табл. 2). Також реєстрували певну залежність між концентрацією посівної дози тест-культур *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* та ефективністю випробуваного зразку препарату: за поступового десятикратного зниження концентрації посівної дози культур збільшувалися діаметри зон пригнічення росту культур навколо аплікації препарату. Діаметри зон пригнічення росту тест-культури *E. coli* за вмісту КУО в 1 см^3 $4,3 \times 10^9$ навколо зони аплікації зразку 2 становили > 8 мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $4,3 \times 10^8 \approx 15$ мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $4,3 \times 10^7 > 21$ мм. Діаметри зон пригнічення росту тест-культури *B. cereus* за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^9$ навколо зони аплікації зразку 2 становили 13 мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^8$ – 18 мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^7$ – 20 мм.

Діаметри зон пригнічення росту тест-культури *S. aureus* за вмісту КУО в 1 см^3 $5,5 \times 10^9$ навколо зони аплікації зразку 2 становили 12 мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^8$ 15 мм; за вмісту КУО в 1 см^3 $3,5 \times 10^7$ – 22 мм. Культуру *L. ivanovii* випробовували лише в концентрації 5×10^8 КУО/см³, зона пригнічення препаратом становила 13 мм; культуру *Y. enterocolitica* випробовували в концентрації 9×10^8 КУО/см³ – зони пригнічення становили 22 мм.

Порівнюючи дію зразку 1 та 2 необхідно зазначити, що щодо тест-культур *E. coli*, та *S. aureus* антимікробна активність була вищою в зразку 2.

Щодо тест-культури *L. ivanovii* значно ефективнішим виявився зразок 1; щодо тест-культури *Y. enterocolitica* – зразок 2. Встановлено, що випробувані

варіанти зразку 1 та № 2, із вмістом відповідно 0,05г та 0,10 г нізину, проявляли виражену інгібуючу дію *in vitro* на ріст тестових культур *E. coli*, *B. cereus*, *S. Aureus*.

Отже, кращою антимікробною дією володіє зразок 2 з таким компонентним складом: бактеріоцину нізину – 0,10 г; 40 % молочної кислоти 10 мл; дистильованої води 89,9 мл, він є ефективнішим щодо більшості тестових мікроорганізмів. Засіб дістав назву постбіотик «Бактеріосан», склад його було запатентовано (патент України на винахід № 119841 «Постбіотик «Бактеріосан» для органічного вирощування птиці» опубл. 12.08 2019, Бюл. № 15).

Бактерицидна дія окремих компонентів постбіотика (молочна кислота та бактеріоцин нізин) достатньої ефективності не виявили. Їхню антимікробну активність щодо більшості тест-культур мікроорганізмів можна охарактеризувати як «+» – слабка антибактеріальна активність. Зі зниженням концентрації тест-культур мікроорганізмів активність зразку 1 дещо зростала, однак менше порівняно зі зразком 2.

Отримані результати вказують на перспективність подальшого вивчення дії постбіотику (зразку 2) *in vivo* для застосування його у терапії птиці за інфекційних захворювань, спричинених патогенними бактеріями з набутою полірезистентністю до антибіотиків.

Позитивним є натуральність постбіотику «Бактеріосан», він є засобом на основі натуральних компонентів, отриманих внаслідок мікробіологічного синтезу з біомаси пробіотичних бактерій, обидві його діючі речовини (бактеріоцин нізин і молочна кислота) є метаболітами симбіотичної мікрофлори кишечника ссавців. Отже, він може бути випробуваний в умовах органічного господарства для профілактики захворювань за вирощування курей, а також для зменшення мікробної забрудненості підстилки та повітря приміщення.

Визначення термінів придатності постбіотику через 6 та 12 місяців зберігання.

Зберігали готовий зразок 2 (концентрація 0,10 г) у темному прохолодному місці впродовж 12 місяців. За цей час його активність було двічі перевірено на тест-культурах різних мікроорганізмів та в різних концентраціях. Дослідження проводили в трьох повторях. Через 6 місяців зберігання випробування антимікробної дії препарату показало високий рівень його активності. Зони затримки росту тестових мікроорганізмів навколо зон аплікації препарату були в усіх випадках не меншими за 10 мм. Це є досить високим показником з огляду на можливість набуття полірезистентності мікроорганізмами до антибактеріальних препаратів. Найбільша зона інгібіції росту навколо зон аплікації препарату була зафіксована в чашках Петрі з колоніями тест-культури *Yersinia enterocolitica* (9×10^8 КУО/см³) – 20 мм. Найменша (10 мм) – до тест-культури *Listeria ivanovii* (5×10^8 КУО/см³). Отже, до розробленого нами постбіотику не розвивається стійкість мікроорганізмів.

Проведеними дослідженнями встановлено, зниження активності дії постбіотику зі збільшенням термінів його зберігання. Однак вказані в таблиці 3 зони затримання росту мікроорганізмів свідчать про достатню стабільність та ефективну бактерицидну дію розробленого нами препарату впродовж 6 місяців та дещо знижену – через 12 місяців зберігання його в розчині (табл. 3).

Таблиця 3

Антимікробна стабільність постбіотику *in vitro*, $M \pm m$, $n = 5$

Тест-культура	Зона затримки росту культури, мм	
	6 місяців	12 місяців
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^9$ КУО/см ³)	+	–
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^8$ КУО/см ³)	++	+
<i>Escherichia coli</i> ($4,3 \times 10^7$ КУО/см ³)	++	+
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^9$ КУО/см ³)	+	–
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^8$ КУО/см ³)	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ($3,5 \times 10^7$ КУО/см ³)	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^9$ КУО/см ³)	+	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^8$ КУО/см ³)	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ($5,5 \times 10^7$ КУО/см ³)	++	+

<i>Listeria ivanovii</i> (5×10^8 КУО/см ³)	+	–
<i>Yersinia enterocolitica</i> (9×10^8 КУО/см ³)	++	++

Водночас, навіть через такий тривалий час зберігання проявлялася його антимікробна дія. Найкраще відбулася затримка росту колоній тест-культури *Yersinia enterocolitica* (9×10^8 КУО/см³) – навіть через 12 місяців зберігання розчину зона затримки росту становила 15 мм. Аналогічний діаметр зони затримки росту реєстрували на чашках Петрі з тест-культурою *Bacillus cereus* ($3,5 \times 10^7$ КУО/см³), однак концентрація мікроорганізмів була на порядок нижчою. Щодо *Bacillus cereus* у концентрації $3,5 \times 10^8$ КУО/см³ – зона затримки росту становила 11 мм. Практично однаковою виявилась бактерицидна дія препарату, який зберігали протягом року, на *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. Діаметри 12, 10, 8 мм та 11, 10, 8 відповідно до концентрацій мікроорганізмів 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 . Отже, можна зробити висновок, що розроблений нами протимікробний препарат постбіотик «Бактеріосан» є ефективним щодо тест-культур мікроорганізмів та є стабільним упродовж 6 та 12 місяців зберігання його в прохолодному місці. Однак, препарат дещо втрачає свою ефективність із плином часу. Рекомендований термін зберігання 6 місяців.

Визначення нешкідливості постбіотику.

Препарат додавали в питну воду в дозі 1, 2, 5, 10 мл/л та випоювали щоденно десятьом білим мишам лінії Wistar (Вістар) масою 18-20 грам. За тваринами було встановлено щоденний нагляд упродовж 14 діб. У випадку загибелі однієї миші перевірка має повторюватись у тій же дозі на подвійній кількості тварин. У повторному досліді миші повинні залишитися живими.

Під час визначення нешкідливості постбіотика «Бактеріосан» препарат додавали у питну воду в дозі 1, 2, 5, 10 мл/л і випоювали десятьом білим мишам масою від 18 до 20 грам щоденно. За тваринами було встановлено щоденний нагляд упродовж 14 діб. За час спостереження жодна з тварин не загинула, усі були активні, охоче споживали корм.

Після завершення досліду тварин забивали, візуальним оглядом оцінювали тканини й органи. Експериментально встановили, що за випоювання мишам постбіотику «Бактеріосан» із питною водою в дозі 1, 2, 5, 10 мл/л захворювань та загибелі тварин упродовж усього експерименту не відмічалось. Етологічні показники дослідних мишей були аналогічними таким у контрольних мишей. Введення підвищених доз препарату не вплинуло на зовнішній вигляд печінки, селезінки, нирок та органів травлення тварин, що підтверджувалось даними патологоанатомічного розтину мишей після планової еутаназії. Аналогічні результати отримали за введення пробіотику «*LactoPharm LP12*» внутрішньочеревно та підшкірно по 0,5 см³ білим мишам. Препарат не спричиняв місцево-подразнюючої, шкірно-резорбтивної та сенсibiliзуючої дії, не викликав клінічних змін та порушень в роботі систем органів мишей.

Випробуваний постбіотик пройшов випробування, протягом всього терміну спостереження: всі тварини були активними, охоче споживали корм і воду, стан видимих слизових оболонок, шкіри та волосяного покриву – без змін, у жодної тварин не виявлялись ознаки інтоксикації, не загинула жодна з дослідних тварин, групова маса тіла мишей не знижувалась в порівнянні з вихідною масою.

Розроблений і випробуваний препарат є перспективним для здійснення корекції ендомікрофлори травного каналу тварин, в тому числі за органічного вирощування, найбільш перспективними, на нашу думку, є саме препарати мікробіологічного походження.

Оскільки встановлено антимікробну активність постбіотику «Бактеріосан», а саме випробовуваний препарат проявив свою ефективність у лабораторних умовах, вважаємо за доцільне здійснювати їхнє подальше випробування в науково-господарських дослідках у якості натуральних профілактичних препаратів.

Висновки

1. Проведеними дослідженнями встановлено, зниження активності дії постбіотику зі збільшенням термінів його зберігання. Однак вказані в

таблиці 3 зони затримання росту мікроорганізмів свідчать про достатню стабільність та ефективну бактерицидну дію розробленого нами препарату впродовж 6 місяців та дещо знижену – через 12 місяців зберігання його в розчині

2. Випробуваний постбіотик пройшов випробування на мишах. Препарат не токсичний. У жодної з тварин не виявлялось ознак інтоксикації, маса тіла не знижувалась, жодна тварина не загинула.
3. Кращою антимікробну дію проявляв дослідний зразок пробіотику №2 (в 100 мл препарату містилось: бактеріоцину нізину – 0,10 г; 40 % молочної кислоти 10 мл; дистильованої води 89,9 мл) він є ефективнішим щодо більшості тестових мікроорганізмів. Засіб дістав назву постбіотик «Бактеріосан», склад його було запатентовано.

Література

1. Rolf Shah A. Probiotic bacteria: functional properties and awareness towards Indian consumers in consuming probiotic food supplements. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary* . 2015. Vol. 2(3). P. 392 – 403.
2. Cebeci A., Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*. 2003. Vol. 20. P. 511-518.
3. Pali A., Hungin S., Mitchell C. R., Whorwell P. Probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms - an updated evidence-based international consensus. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2018. 47. Suppl. 1 DOI: 10.1111/apt.14539
4. Kovalenko, V., Kucheruk, M., & Chechet, O. (2022). Effect of the Biosapin probiotic and the Biolide disinfectant on the microclimate of poultry houses. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 44-51. DOI: 10.31548/ujvs.13(1).2022.44-51.
5. Кучерук М. Д., Засєкін Д. А., Димко Р. О. Мікробіологічне та санітарно-гігієнічне значення еубіозу кишечника продуктивних тварин. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8 (2) P. 287-293.

6. Batdorj B., Trinetta V., Dalgarrondo M. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 103. P. 584–593.
7. Cicenia A., Santangelo F., Gambardella L. Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2016. December. Vol. 50. P. 140-144.
8. Поліщук А. А., Булавкіна Т. П. Сучасні кормові добавки в годівлі тварин та птиці. *Вісник Полтавської державної аграрної академії*. 2010. № 2. С. 63-66.
9. Moreno I., Lerayer A. L., Baldini V. L., Leitão M. Fd. F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000. Vol. 31 (3). P. 184-192.
10. Отченашко В. В. Використання молочної кислоти у тваринництві : науково-практичні рекомендації. Київ, 2012. 46 с.

UDK: 636.087.7-048.24

Kucheruk, M. D.

doctor of Veterinary Sciences, associate professor,
associate professor of the department of animal hygiene and veterinary support of the
canine service of the National Police of Ukraine
Institution of higher education “Podilskyi State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E -mail: kucheruk.md@gmail.com
[ORCID: 0000-0002-8048-533X](https://orcid.org/0000-0002-8048-533X)

Tokarchuk T.S.

candidate of agricultural sciences, associate professor,
assistant of the department of animal hygiene and veterinary support of the canine
service of the National Police of Ukraine
Institution of higher education “Podilskyi State University”
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: ttocarchuk@gmail.com
[ORCID: 0000-0001-6030-0572](https://orcid.org/0000-0001-6030-0572)

Trach V.V.

candidate of Veterinary sciences,
assistant of the department of animal hygiene and veterinary support of the canine
service of the National Police of Ukraine
Institution of higher education "Podilskyi State University"
Kamianets-Podilskyi, Ukraine
E-mail: slavko2205@gmail.com
ORCID: 0000-0002-1040-3327

PRECLINICAL TRIALS OF THE PROPHYLACTIC PRECAUTION POSTBIOTIC

Abstract. *The article describes the laboratory and preclinical studies of the microbiological drug developed by us. Its antibacterial properties were determined at different concentrations of the bacteriocin nisin. Various concentrations of such strains of microorganisms were used as test cultures in laboratory studies of antimicrobial activity Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria ivanovii, Yersinia enterocolitica.*

The mechanism of biological action of bacteriocins is primarily related to disruption of the cytoplasmic membranes of microorganisms sensitive to them. Unlike antibiotics, which act rather selectively, bacteriocins also affect antibiotic-resistant strains of microorganisms, are completely broken down and excreted from the body. Bacteriocin nisin is produced by a strain of microorganisms Lactococcus lactis, has antibacterial properties against a wide range of pathogenic microorganisms, is used as a preservative in the food industry. When used internally, lactic acid has an anti-fermenting, antiseptic, and irritating effect. Suppresses the growth and development of conditionally pathogenic and putrefactive microflora of the gastrointestinal tract, stimulates the process of restoration of intestinal villi, which increases the surface area for absorption of nutrients. The test of the second experimental sample on mice showed that the drug did not cause local irritation, skin resorptive and sensitizing effects, did not cause clinical changes and disorders in the work of organ systems of mice. The developed and tested drug is promising for the correction of the endomicroflora of the alimentary canal of animals, including for organic farming, the most promising, in our opinion, are the drugs of microbiological origin.

Key words: *antibacterial effect, preclinical tests, harmlessness, probiotic, postbiotic, prophylactic drug, microorganism strain test.*

REFERENCES

1. Rolf Shah A. Probiotic bacteria: functional properties and awareness towards

Indian consumers in consuming probiotic food supplements. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary* . 2015. Vol. 2(3). P. 392 – 403.

2. Cebeci A., Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*. 2003. Vol. 20. P. 511-518.

3. Pali A., Hungin S., Mitchell C. R., Whorwell P. Probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms - an updated evidence-based international consensus. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2018. 47. Suppl. 1 DOI: 10.1111/apt.14539

4. Kovalenko, V., Kucheruk, M., & Chechet, O. (2022). Effect of the Biosapin probiotic and the Biolide disinfectant on the microclimate of poultry houses. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 13(1), 44-51. DOI: 10.31548/ujvs.13(1).2022.44-51.

5. Kucheruk M.D., Zasekin D.A., Dymko R.O. Microbiological and sanitary-hygienic significance of intestinal eubiosis of productive animals. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8 (2) P. 287-293.

6. Batdorj B., Trinetta V., Dalgalarondo M. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. 2007. Vol. 103. P. 584–593.

7. Cicenia A., Santangelo F., Gambardella L. Protective Role of Postbiotic Mediators Secreted by *Lactobacillus rhamnosus* GG Versus Lipopolysaccharide-induced Damage in Human Colonic Smooth Muscle Cells *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2016. December. Vol. 50. P. 140-144.

8. Polishchuk A. A., Bulavkina T. P. Modern feed additives in feeding animals and poultry. *Bulletin of the Poltava State Agrarian Academy*. 2010. No. 2. P. 63-66.

9. Moreno I., Lerayer A. L., Baldini V. L., Leitão M. Fd. F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000. Vol. 31 (3). P. 184-192.

10. Otchenashko V.V. The use of lactic acid in animal husbandry: scientific and practical recommendations. Kyiv, 2012. 46 p.