



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **103296**

(13) **U**

(51) МПК

**C12R 1/125** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 05743**

(22) Дата подання заявки: **11.06.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.12.2015**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.12.2015, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):

**Авдєєва Лілія Василівна (UA),  
Хархота Максим Андрійович (UA),  
Нечипуренко Олексій Олександрович  
(UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ  
ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ  
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,  
вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)**

(74) Представник:

**Піскова Олена Віллівна, реєстр. №289**

**(54) ШТАМ BACILLUS SUBTILIS ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ З ПРОБІОТИЧНИМИ  
ВЛАСТИВОСТЯМИ**

(57) Реферат:

Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7513 для одержання кормової добавки з пробіотичними властивостями.

UA 103296 U



Корисна модель належить до сільськогосподарської мікробіології та біотехнології, а саме до нового штаму *Bacillus subtilis* для одержання кормової добавки з антагоністичними властивостями щодо патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, що може використовуватися при виробництві пробіотичних препаратів для лікування та профілактики

хвороб сільськогосподарських тварин.

В останні роки пробіотики - кормові добавки на основі штамів живих мікроорганізмів - все частіше застосовуються при вирощуванні сільськогосподарської худоби, при цьому вони забезпечують позитивний вплив на фізіологічні, біохімічні та імунні реакції через стабілізацію та оптимізацію функції його нормальної мікрофлори. Пробиотики застосовуються при дисбактеріозах, для регулювання мікробіологічних процесів у травному тракті, профілактики та лікування деяких розладів травлення інфекційної та аліментарної етіології, як замітники антибіотиків і т.д. За ефективністю дії пробіотичні препарати не поступаються деяким антибіотикам та хіміотерапевтичним засобам, але при цьому вони не спричиняють згубного впливу на нормальну мікрофлору травного тракту, не забруднюють продукти тваринництва та навколишнє середовище, тобто є екологічно чистими.

На сьогоднішній день пробіотики на основі біфідобактерій, лактобактерій, аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* знаходять широке застосування для профілактики та лікування інфекційних захворювань людини, сільськогосподарських тварин та птахів. Бацили, що складають основу багатьох добре відомих пробіотичних препаратів (бактисубтил, біосубтил, біоспорин, споробактерин, ентерогермін та інші), характеризуються різними спектрами антимікробної активності. Серед пробіотиків на основі штамів *Bacillus subtilis* на Україні застосовується біопрепарат Ендоспорин, що являє собою етіотропний пробіотик для лікування та профілактики кишкових та гнійних інфекцій та післяпологових ендометритів у сільськогосподарських тварин (Патент України №7669, МПК А61К 35/74, опубл. 01.08.2006). Він характеризується антагоністичною активністю щодо штамів бактерій родів *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Candida*. До його складу входять ліофілізовані життєздатні клітини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7142 та *B. subtilis* IMB B-7143, які доповнюють один одного за біологічною активністю. Проте недоліком даного препарату можна вважати його недостатньо високу ефективність, яка зумовлена частковою нейтралізацією пробіотичної складової травними соками шлунково-кишкового тракту.

Є також відомим пробіотичний препарат "Субалін" (патент RUN № 2035185, опубл. 20.05.95), що містить рекомбінантний штам *Bacillus subtilis* ВКПМ В-4759, який характеризується антагоністичною активністю по відношенню до широкого спектру патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів та антивірусною активністю за рахунок синтезу інтерферону. Проте антагоністична активність вказаного штаму стосовно патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів є недостатньою.

У патенті РФ № 2388813, опубл. 10.05.2010 р., описаний штам *Bacillus subtilis* 3А (№282 ГИСК ім. Л.А. Тарасевича), що входить до складу пробіотичного препарату, що характеризується високою антагоністичною та бактерицидною активністю за рахунок наявності амілолітичної активності. Проте додаткове підвищення рівня амілаз в організмі може мати небажаний вплив на процеси травлення.

Задача даної корисної моделі полягає у створенні штаму *Bacillus subtilis* для одержання кормової добавки з пробіотичними властивостями, який забезпечує високий рівень антагоністичної активності щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів та має здатність додатково синтезувати каротиноїди.

Поставлена задача вирішується шляхом створення штаму *Bacillus subtilis* 1MB B-7513, який призначений для одержання кормової добавки з пробіотичними властивостями.

Заявлений штам має широкий спектр антагоністичної активності щодо патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів та синтезує каротиноїди, що являють собою біологічно активні пігменти, які є ізомерами каротину, що у печінці перетворюється на вітамін А. Каротиноїди та їх метаболіти мають вплив на цілий ряд біологічних процесів, зокрема виявляють антиоксидантний вплив, що є важливим для створення оптимального раціону харчування для сільськогосподарських тварин, та дає можливість одночасного контролю інфекцій та компенсації дефіциту каротину в організмі тварин.

Інфекційні захворювання шлунково-кишкового тракту та дефіцит вітаміну А призводить до значних втрат поголів'я птиці, зниження маси тіла, рівня імунітету, продуктивності тощо. Зазвичай вирішення цих проблем базується на додаванні у корм синтетичного β-каротину (вітамінні добавки вітатон, вітадекс), міцелія каротинсинтезувальних грибів *Blakeslea trispora* та дріжджів *Rhodotorula* spp. (ліколін, лікоцинол), а також біологічних препаратів на основі пробіотичних штамів бактерій роду *Bacillus* (BioGrow, BioPlus 2B, Toyocerin), які відновлюють

видовий і кількісний склад мікробіоти кишечника та покращують загальний стан організму. Проте на сьогоднішній день не існує комплексних засобів, які б поєднували пробіотичні властивості та якості вітамінної добавки.

Заявлений штам *Bacillus subtilis* IMB B-7513 ізольований з Оболенського заливу м. Києва у 2010 році

Спосіб одержання штаму: штам отримують шляхом посіву на поживні середовища: МПА, ТСА, сусло-агар, Гаузе № 2, КА та ін.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму:

грампозитивні аеробні спороутворюючі палички. На м'ясо-пептонному агарі (МПА), триптон-соевому агарі (ТСА), картопляному агарі (КА), середовищах Гаузе № 2 та Громико виявлено значний ріст.

На МПА утворює складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, жовто-гарячого кольору, краї правильної форми.

На ТСА утворює складчасті колонії з підвищеним центром жовто-гарячого кольору, консистенція пастоподібна, краї правильної форми.

На середовищі Громико - складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, яскраво червоного кольору, краї правильної форми.

На середовищі Гаузе 2 - складчасті колонії з підвищеним центром, консистенція пастоподібна, яскраво червоного кольору, краї правильної форми.

На картопляному агарі - колонії світло-бежевого кольору, консистенція пастоподібна, краї рівні.

В мазках з колоній, які виростили на ТСА через 18 годин можна побачити прямі паличкоподібні клітини розміром  $2,5 \times 0,4$  мкм, що розташовані поодинокі, попарно та ланцюгом. Клітина при спороутворенні не роздувається, після росту на глюкозному агарі в протоплазмі вакуолі не утворюються.

На МПБ культура утворює плівку. Ферментує глюкозу, фруктозу, арабінозу, манніт, ксилізу з утворенням кислоти, дає позитивну реакцію Фогеса-Проскауера, гідролізує ескулін, крохмаль, казеїн, желатину, росте при 7 % NaCl, не утилізує цитрат, не використовує пропіонат. Культура не росте в анаеробних умовах і при 10 % NaCl, не утворює газу з  $\text{NO}_3^-$  в анаеробних умовах. Каталазна та оксидазна реакції позитивні. Штам здатен утворювати пігменти каротиноїдної природи.

Умови культивування: культивується на середовищі сусло-агар, МПА, Громико, картопляний агар за температури  $37^\circ\text{C}$ .

Активність штаму, а також інші промислові показники: високоактивний штам, який має виражені антагоністичні властивості щодо широкого спектра патогенних та умовно-патогенних бактерій, а саме, стафілококів, стрептококів (зони затримки росту  $>15$  мм), ешерихій (зони затримки росту  $>12$  мм), сальмонел (зони затримки росту  $>10$  мм).

Спосіб визначення: антагоністичні властивості досліджували методом радіальних штрихів (Єгоров, 1969). 18-год. культура висівається в центр чашки діаметром 12 см на площу, яка окреслена кругом діаметром 2,5 см. Через 3 доби інкубування за температури  $37^\circ\text{C}$  підсівають радіальним штрихом тест-культури з бактеріальної суспензії  $5 \times 10^8$  кл/мл. Зони затримки росту враховують після 18-24 год. інкубування. Контролем слугували чашки без *Bacillus subtilis* IMB B-7513.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового культивування штаму: штам зберігається на середовищі сусло-агар, Громико (МПА+СА), агаризованому середовищі Гаузе № 2 під шаром стерильного вазелінового масла. Пересів 1 раз в рік.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму: розмноження можна проводити на середовищах аналогічного складу.

Відомості про патогенність: штам не патогенний для теплокровних тварин.

На кресленні наведені показники продуктивності каротинсинтезувальних штамів (вихід АСБ та кількість каротиноїдних пігментів).

Корисна модель пояснюється прикладами конкретного здійснення.

Приклад 1. Вирощування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7513.

Культивування *Bacillus subtilis* IMB B-7513 проводили в умовах глибинного культивування у періодичних умовах з використанням синтетичного середовища ( $\text{pH}=7,0 \pm 0,3$ ) наступного складу (г/л):  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -1,29,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -9,60,  $\text{MgSO}_4$ -0,18, глюкоза - 20,00 та напівсинтетичного середовища ( $\text{pH}=7,5 \pm 0,2$ ) (г/л): м'яса (ДСТУ 3696-98) - 23;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -4,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -2,0;  $\text{FeSO}_4$ -0,035. Норма внесення інокуляту культури бактерій складала 5 об. %, що відповідало  $10^6$ - $10^7$  колонієутворювальних одиниць на 1 мл середовища (КУО/мл). Культивування бактерій здійснювали на качалках ( $n=200$  об/хв) за температури  $37^\circ\text{C}$  протягом

36 годин. Параметри росту (фази росту, питому швидкість росту, час генерації) визначали згідно з рекомендаціями Перт С. Дж. (Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - М.: Мир, 1978. - 116 с.)

Приклад 2. Дослідження антагоністичної активності заявленого штаму.

Необхідними характеристиками штамів для одержання пробіотичних препаратів є висока антагоністична активність щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, стійкість до низьких значень рН середовища та жовчі, низька адгезивна активність, відсутність генів стійкості до антибіотиків, а також авірулентність.

Антагоністичну активність штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7513 досліджували щодо колекційних тест-культур: *Salmonella thyphimurium* УКМ B-928, *S. enterica* УКМ B-920, *S. derby* ДІСК 1519, *Shigella flexneri* ДІСК 36/59, *Proteus vulgaris* УКМ B-905, *P. vulgaris* УКМ U-8, *Staphylococcus aureus* УКМ B-918, *Escherichia coli* УКМ B-906, отриманих з колекції культур відділу антибіотиків ІМБ НАН України. Антагоністичну активність заявленого штаму щодо вказаних патогенних мікроорганізмів вивчали методом відстроченого антагонізму. Рівень антагоністичної активності досліджуваних штамів оцінювали за зонами затримки росту тест-культур і виражали у мм. Штам вважали низько активним, якщо зона затримки росту тест-культур становила <10 мм, середньо активним - від 10 до 14 мм, високо активним -  $\geq 15$  мм. Результати дослідження є представленими у таблиці 1.

Таблиця 1

Антагоністична активність штаму  
*Bacillus subtilis* IMB B-7513 щодо колекційних тест-культур

Досліджувана тест культура	Зона затримки росту, мм
<i>S. thyphimurium</i> УКМ B-928	11,1 $\pm$ 0,4
<i>S. enterica</i> УКМ B-920	9,6 $\pm$ 0,5
<i>S. derby</i> ДІСК 1519	9,1 $\pm$ 0,5
<i>S. flexneri</i> ДІСК 36/59	16,7 $\pm$ 0,7
<i>P. vulgaris</i> УКМ B-905	20,0 $\pm$ 0,7
<i>P. vulgaris</i> УКМ U-8	15,3 $\pm$ 0,5
<i>S. aureus</i> УКМ B-918	22,3 $\pm$ 0,6
<i>E. coli</i> УКМ B-906	12,4 $\pm$ 0,5

Таким чином було встановлено, що заявлений штам характеризувався високою антагоністичною активністю щодо *Shigella flexneri* ДІСК 36/59, *Proteus vulgaris* УКМ B-905, *P. vulgaris* УКМ U-8 та *Staphylococcus aureus* УКМ B-918. Середній рівень антагонізму штам проявляв щодо *Salmonella thyphimurium* УКМ B-928 та *Escherichia coli* УКМ B-906. Визначено, що *Bacillus subtilis* IMB B-7513 характеризувався низьким рівнем антагоністичної активності щодо *S. enterica* УКМ B-920, *S. derby* ДІСК 1519. Представлені дані свідчать про те, що заявлений штам виявляє антагоністичну активність стосовно усіх перевірених тест-культур.

Відомо, що штами, які передбачають для використання як пробіотичні, повинні бути стійкими до низьких значень рН та концентрацій жовчі не менше 0,4 %. Здатність штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7513 рости за різних значень рН середовища, за наявності жовчі та глікохолевої кислоти вивчали в умовах глибинного культивування у рідкому живильному середовищі наступного складу (г/л):  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -1,29,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -9,60,  $\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ -0,18, глюкоза - 10,00. Ріст штамів детектували шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини.

Було встановлено, що заявлений штам мав здатність до росту при значеннях рН від 5 до 8. Крім того, за наявності в середовищі культивування 0,4 % жовчі характер пігментоутворення не змінювався, а оптична густина культуральної рідини *Bacillus subtilis* IMB B-7513 становила 1,0 одиниць, що відповідно складало 67 % від контролю. За умов подальшого збільшення концентрації жовчі у середовищі ріст досліджуваних каротинсинтезувальних штамів був відсутнім. Крім того, при 4,0 % вмісті глікохолевої кислоти (компонент жовчі) в середовищі ріст та пігментоутворення штаму не відрізнялося від такого для контролю. Таким чином, заявлений штам має здатність рости за низьких значень рН та у присутності жовчі та глікохолевої кислоти в умовах шлунково-кишкового тракту.

Адгезивні властивості заявленого штаму вивчали за методом В.І. Брилис (Брилис В.І., Ленцер Х.П., Ленцер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. - 1989. - № 4. - С. 210-212) на еритроцитах людини I групи крові з визначенням середнього показника адгезії (СПА), коефіцієнта участі еритроцитів (КУЕ) та індексу адгезивності

мікроорганізмів (ІАМ). Бактерії вважали неадгезивними при  $ІАМ \leq 1.75$ , низькоадгезивними - при ІАМ від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними - від 2,51 до 4,0, високоадгезивними -  $\geq 4,0$ . Було показано, що заявлений штам мав низький рівень адгезивної активності, про що свідчить його індекс адгезивності, що становив  $2,0 \pm 0,06$ . Цей факт підтверджує можливість використання його у складі кормової добавки для введення тваринам.

Чутливість заявленого штаму до антимікробних препаратів визначали у відповідності диско-дифузійним методом (May D. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test // Clinical and Laboratory Standards Institute. - 2010. - Vol. 30, № 1-P. 1-15) на агарі Мюллера-Хінтона (Himedia, Індія) з використанням комерційних дисків (Himedia, Індія) з спектиноміцином, гентаміцином, тілозином, амоксициліном, амоксиклавом, окситетрацикліном, доксицикліном, колістином, флорфені колом, енрофлоксацином, флумеквіном та триметопримом. Контроль якості дисків з антибіотиками та агару Мюллера-Хінтона проводили з використанням еталонних штамів *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, які отримані з Української колекції мікроорганізмів ІМБ НАН України. В результаті експериментів встановлено, що штам *Bacillus subtilis* ІМБ В-7513 є помірно стійким до спектиноміцину та окситетрацикліну, чутливим до гентаміцину, амоксициліну, амоксиклаву, доксицикліну, тілозину, флорфеніколу, енрофлоксацину, флумеквіну та триметоприму.

В результаті дослідження патогенності заявленого штаму роду *Bacillus subtilis* ІМБ В-7513 встановлено, що внутрішньочеревинне введення мишам  $1 \times 10^{10}$  КУО досліджуваного штаму не призводило до загибелі тварин, що свідчить про його авірулентність. Штам був також нетоксичним та нетоксигенним, оскільки упродовж 3-х діб з моменту введення культуральної рідини штаму, зокрема прогрітої, не загинуло жодної тварини. Слід зазначити, що при рості тварин не було виявлено патоанатомічних змін у серці, печінці, нирках, кишечнику, легенях та шлунку мишей.

Приклад 3. Здатність штаму *Bacillus subtilis* ІМБ В-751 до синтезу каротиноїдів.

Особливості росту штамів вивчали в умовах глибинного культивування у періодичних умовах з використанням напівсинтетичного середовища, як описано у Прикладі 1. Кількість життєздатних клітин бактерій у середовищі визначали шляхом висівання 0,1 мл з десятикратних розведень суспензії на м'ясо-пептонний агар. Екстракцію пігментів проводили шляхом гомогенізації сухої біомаси штаму *B. subtilis* ІМБ В-7513 у ступці з поступовим додаванням суміші хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів у біомасі (мг/г, показник, який відображає закономірності синтезу каротиноїдів і не пов'язаний з накопиченням біомаси у культуральній рідині) встановлювали на основі калібрувальних кривих, отриманих шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідин та екстрактів пігментів за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ( $\bar{X}_{\text{сер.}}$ ), середню квадратичну похибку ( $S_{\bar{X}_{\text{сер.}}}$ ) за кількості повторів дослідів  $n=6$  та рівнях значимості 0,05.

Основними показниками продуктивності каротинсинтезувальних штамів є вихід АСБ та кількість каротиноїдних пігментів. Було встановлено, що синтез каротиноїдних пігментів штамом *B. subtilis* ІМБ В-7513 на напівсинтетичному середовищі починався з кінця експоненціальної фази росту. Результати щодо продуктивності синтезу каротиноїдів є представленими на кресленні. При культивуванні на напівсинтетичному середовищі максимальний вихід біомаси штаму *B. subtilis* ІМБ В-7513 становив  $4,5 \pm 0,2$  г/л, а загальний вміст каротиноїдів у біомасі заявленого штаму складав  $375 \pm 25$  мг/г АСБ, що свідчить про високий рівень синтезу каротиноїдів заявленим штамом.

Приклад 4. Дослідження ефективності використання штаму *B. subtilis* ІМБ В-7513 при введенні у раціон курчат.

Досліди проводили з використанням триденних курчат кросу "Н&Н Браун Нік", які були надані ТОВ НВП "Біо-Тест-Лабораторія". Методом випадкової вибірки курчата були поділені на групи: 1 група ( $n=4$ ) - отримувала стартовий корм "Мультигейн" (АТ "Київ-Атлантик Україна"), 2 група ( $n=4$ ) - до корму "Мультигейн" додавали синтетичний  $\beta$ -каротин у концентрації 10 тис. МЕ/кг корму. Курчата 3 групи (по 6 особин в кожній) отримували стартовий корм з додаванням біомаси штаму *Bacillus subtilis* ІМБ В-7513, Заключна концентрація бактерій у кормі становила  $1 \times 10^{10}$  КУО/г корму. Годували курчат згідно з інструкціями виробника корму. Дослід тривав 18 днів.

Дослідження мікробіоценозу кишечника курчат проводили у динаміці на 1 та 18 день експерименту шляхом висіву з десятикратних ( $10^{-1}$ - $10^{-10}$ ) розведень 1 г їх фекалій у фізіологічному розчині NaCl на стандартний набір елективних та диференційно-діагностичних

середовищ. Вміст бактерій в досліджуваному матеріалі виражали кількістю колонієутворювальних одиниць в 1 г фекалій (КУО/г).

В результаті мікробіологічного дослідження кишкових випорожнень обстежених курчат на початку досліду виявлено порушення мікробіоценозу кишечника. Так, кількісний вміст бактерій родини Enterobacteriaceae, родів Enterococcus і Staphylococcus складав 6,0, 6,0 і 8,8 lg КУО/г відповідно. При цьому кількісний вміст стафілококів та ентерококів перевищував значення, характерні для нормофлори курчат у  $1 \times 10^6$  та 10 разів, відповідно. У той час бактерії родів Lactobacillus та Bifidobacterium було виділено у кількості 8,3 та 9,3 lg КУО/г фекалій відповідно. Це свідчить про патологічну колонізацію шлунково-кишкового тракту новонароджених курчат, що підпадає під визначення - дисбактеріоз III-го ступеня. При цьому з печінки та жовткового мішка птиці виділялись бета-гемолітичні штами Staphylococcus spp., що свідчить про наявність у обстежених курчат інфекції, етіологічним фактором якої є стафілококи.

Одним з показників ефективності застосування пробіотичних препаратів на основі живих культур мікроорганізмів є нормалізація мікробіоценозу, перш за все кишечника. Годування курчат кормом, що містив штам B. subtilis IMB B-7513, позитивно впливало на відновлення мікробіоценозу кишечника птиці. Так на кінець терміну спостереження у кишковому вмісті курчат групи, яка отримувала заявлений штам реєстрували порівняно з контрольною зменшення кількості бактерій родів Staphylococcus та Enterococcus у 200 й 100 рази відповідно, а також збільшення кількісного вмісту лактобактерій та біфідобактерій у 10 разів. При цьому слід зазначити, що кількість життєздатних клітин B. subtilis IMB B-7513 в кишковому вмісті досліджуваних курчат становила  $7,6 \times 10^5$  КУО/г, що свідчить про стійкість бактерій до агресивних умов шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Дані стосовно кількісного вмісту мікроорганізмів різних груп у кишечнику є приведеними у таблиці 2.

Таблиця 2

Склад мікробіоценозу товстого кишечника у курчат

Мікроорганізми	Кількісний вміст бактерій (lg КУО/г) у групах на 18 добу експерименту	
	Контрольна група (стартовий корм «Мультигейн»)	Група, яка отримувала штам добавки штаму B. subtilis IMB B-7513
Enterococcus spp.	4,47±0,18	2,22±0,27
Staphylococcus	6,1±0,25	4,78±0,15
Enterobacteriaceae	6,92±0,15	6,16±0,22
Lactobacillus	8,36±0,22	9,45±0,17
Bifidobacterium	9,30±0,17	10,47±0,20
Дріжджеподібні гриби	0,00	0,00

Нормалізація мікробіоценозу кишечника обстежених курчат, які отримували з кормом культуру B. subtilis IMB B-7513, супроводжувалася швидкими темпами приросту їх маси, яка на 9 день експерименту перевищувала таку в контрольній групі на 92,8 %, а на 18 день - на 21,6 %.

Приклад 5. Дослідження ефективності використання штаму B. subtilis IMB B-7513 для корекції експериментального дисбактеріозу у мишей

Проводили дослідження ефективності заявленого штаму B. subtilis IMB B-7513 щодо пробіотичних властивостей та синтезу каротиноїдів. Як еталон в експерименті застосовували комерційний пробіотик субтиспорин, що містить штам Bacillus subtilis 090.

Для моделювання експериментального дисбактеріозу використовували безпородних мишей вагою 18-20 г. Дисбактеріоз у тварин викликали шляхом введення per os антибіотика амоксиклаву (амоксацилін+клавуланова кислота) в дозі 50 мг/тварину 1 раз на добу протягом 14 діб. Потім тварин було розділено на групи: контрольні, а саме група 1 (n=12) - інтактні тварини, які отримували стерильний фізіологічний розчин; група 2 (n=12) з експериментальним дисбактеріозом, які також отримували стерильний фізіологічний розчин, група 3 (n=12) - тварини, які лікувались традиційним для ветеринарії пробіотиком субтиспорином та група 4 - тварини, що per os отримували щоденно протягом 12 діб культуру штаму B. subtilis IMB B-7513. Кількісний вміст бактерій у дозі становив  $10^{10}$  КУО/мл.

Досліджувані штами бацил вирощували в умовах глибинного культивування так, як описано у Прикладі 1. Дослідження мікробіоценозу кишечника мишей проводили у динаміці на 0, 4, 9, 12-у добу корекції дисбактеріозу шляхом висіву з десятикратних ( $10^{-1}$ - $10^{-9}$ ) розведень 1 г їх фекалій

у фізіологічному розчині на стандартний набір елективних та диференційно-діагностичних середовищ. Кількісний вміст біфідобактерій визначали, висіваючи 1 мл суспензії із розведень  $10^{-1}$ - $10^{-9}$  на напіврідке середовища Блаурокока. Лактобактерії визначали висіваючи 0,1 мл суспензії із розведень  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  на тверде MRS середовище, ентерококи - із розведень  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  на середовище Сланец-Бартлі, стафілококи - із розведень  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  на манітол-сольовий агар, мікроорганізми родини Enterobacteriaceae - із розведень  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  на агар МакКонкі, аеробні спороутворюючі бактерії - із розведень  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  після прогрівання за  $t=100^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв. на триптон-соевий агар. Дріжджоподібні гриби роду *Candida* виділяли на середовище Сабуро з розведень  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$ . Вміст бактерій в досліджуваному матеріалі виражали кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 г фекалій (КУО/г).

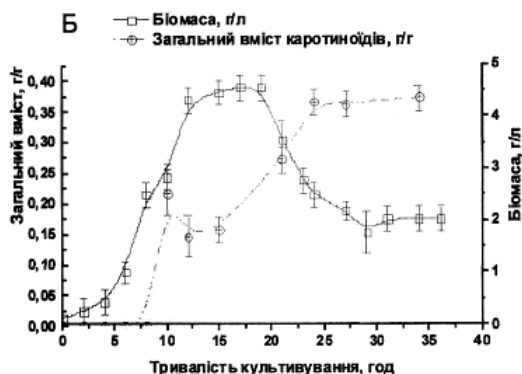
Для моделювання експериментального дисбактеріозу було використано амоксиклав, р-лактамний антибіотик широкого спектра дії. На 14-у добу введення антибіотика у тварин реєстрували різке зниження популяційного рівня нормальної мікробіоти товстого кишечника. Кількість біфідобактерій та лактобактерій знизилась у 800 та 120 разів, ентерококів - у 10 разів у порівнянні з кишковим вмістом інтактних тварин. На фоні зниження загального рівня представників нормофлори спостерігали значне зростання кількості умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ), що вказує на наявність вираженого дисбактеріозу у експериментальних тварин. У кишковому вмісті тварин зареєстровано появу бактерії роду *Proteus* у кількості  $2,2 \times 10^7$  КУО/г фекалій. Також нами було ідентифіковано збільшення числа дріжджоподібних грибів роду *Candida* та бактерій роду *Staphylococcus* приблизно у 10 і 1000 рази, відповідно. Отже, пероральне введення амоксиклаву викликало у тварин дисбактеріоз кишечника III-го ступеня.

Вже на 4-й день корекції спостерігали позитивну динаміку відновлення мікрофлори товстого кишечника у групі 3 та 4. При цьому заявлений штам більш ефективним при корекції кількісного та якісного складу мікробіоти, після його застосування було виявлено підвищення вмісту біфідобактерій та лактобактерій у 5 та 10 разів, відповідно. Разом з тим, реєстрували зниження вмісту лактозонегативних *E. coli*, бактерій родів *Proteus* та *Staphylococcus* у 40, 10 та 20 разів. Подібна позитивна динаміка була виявлена й на 9-й день корекції дисбактеріозу цим штамом. Ефективність препарату субтиспорин виявилась нижчою за таку для бактерій штаму *B. subtilis* IMB B-7513, оскільки на 4-й день його введення було виявлено лише зниження вмісту лактозонегативних *E. coli* та бактерій роду *Staphylococcus* у 20 разів.

Активність препарату субтиспорин виявилась у 10 та 1000 разів нижчою щодо лактозонегативних *E. coli* та бактерій роду *Proteus* порівняно зі штамом *B. subtilis* IMB B-7513, проте на порядок вищою щодо дріжджоподібних грибів.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Bacillus subtilis* IMB B-7513 для одержання кормової добавки з пробіотичними властивостями.



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601