

УДК 579.864: 615.331

DOI: 10.15587/2519-8025.2019.169077

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ЗІ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ КРОЛЯ

Ю. М. Похилько, Н. О. Кравченко

Пробіотичні препарати, що застосовуються у кролівництві, мають у своєму складі бактерії, виділені з різних еконіш. Тому такі препарати є універсальними та рекомендовані для різних видів тварин. Одним із шляхів підвищення ефективності пробіотиків, які використовуються під час розведення кролів, є селекція штамів біологічно активних представників облигатної мікрофлори шлунково-кишкового тракту саме цих тварин.

Мета. Ідентифікувати молочнокислі бактерії, виділені зі шлунково-кишкового тракту кроля, перспективні для створення пробіотичних препаратів. Дослідити антибіотикорезистентність найбільш біологічно активних ізолятів.

Методи. Ідентифікацію молочнокислих бактерій до роду *Lactobacillus* проводили за загальноприйнятими методами. Молекулярно-генетичну ідентифікацію проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції. Для найбільш перспективних штамів визначали чутливість до антибіотиків диско-дифузійним методом та мінімальну інгібуєчу концентрацію антибіотика, що повністю затримувала ріст бактерій.

Результати. Ідентифіковано до роду *Lactobacillus* 250 бактеріальних ізолятів, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, з них 10 найбільш активних відібрано для подальшої роботи. Встановлено, що 40 % відібраних ізолятів молочнокислих бактерій, здатні ферментувати арабінозу, дульцит; 50 % – маніт; 70 % – сорбіт; 80 % – манозу, фруктозу; 90 % – лактозу; 100 % – галактозу, мальтозу, сахаразу, глюкозу; 20 % – рафінозу. Молекулярно-генетичними дослідженнями встановлено, що ізолят *Lactobacillus* sp. 13/2 не має генів типових для видів *L. acidophilus* та *L. helveticus*. Виявлено, що найменше значення мінімальної інгібуєчої концентрації антибіотиків досліджуваних ізолятів виявлено для пеніцилінів пролонгованої дії, що діють бактерицидно, порушуючи синтез клітинної стінки бактерій. Найвище – для ампіциліну, що активний відносно грампозитивних бактерій, на які діє бензилпеніцилін. Отримані результати свідчать про відсутність набутої антибіотикорезистентності. Однак ізолят L-13/2 проявив стійкість до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти.

Висновки. За комплексом морфологічних, культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей з 250 ізолятів молочнокислих бактерій, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, десять найбільш активних попередньо віднесено до філогенетичних груп: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*. Для використання обраного ізоляту *Lactobacillus* sp. 13/2 як основи пробіотичного препарату необхідно застосування додаткових методів ідентифікації для визначення виду.

Встановлено, що досліджувані ізоляти загалом не проявляли антибіотикорезистентність. Перспективний ізолят *Lactobacillus* sp. 13/2 виявив стійкість до деяких антибіотиків. Тому існує необхідність більш детально вивчити стійкість до антибіотиків досліджуваного ізоляту для виключення можливості горизонтального переносу генів резистентності

Ключові слова: молочнокислі бактерії, пробіотики, кролики, антибіотикорезистентність, ідентифікація, полімеразна ланцюгова реакція

Copyright © 2019, О. О. Теренко.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

1. Вступ

Кролівництво є однією з найперспективніших галузей українського тваринництва [1]. Однак у зв'язку з відсутністю сучасних наукових розробок з питань технологій утримання та розведення кролів, виробництво кролятини на сьогодні знизилось у 4,7 рази порівняно з 1980 рр [2]. Серед основних проблем, які заважають ефективному веденню кролівництва, особливе місце займають шлунково-кишкові захворювання тварин, що найчастіше спостерігаються у молодняку та нерідко призводять до загибелі тварин [3]. Упродовж тривалого часу для вирішення даної проблеми використовувались антибіотики. Однак проблема антибіотикотерапії, як у гуманній, так і у ветеринарній медицині, полягає у розвитку резистентності мікроорганізмів до антибіотиків та має вели-

чезне соціально-економічне значення, масштабність якої формулюється документом «Глобальна стратегія ВООЗ по стримуванню резистентності» [4, 5]. Тому в країнах Європейського Союзу вже давно було введено обмеження на використання антибіотиків у тваринництві [6]. Наслідком цього рішення стало інтенсивне впровадження пробіотиків у технології тваринництва, використання яких дає змогу впливати на захисні механізми макроорганізму, нормалізувати метаболічні процеси та роботу шлунково-кишкового тракту тварин [7].

2. Літературний огляд

Пробіотики, які застосовуються для усунення проблем шлунково-кишкового тракту (ШКТ) кролів, мають у своєму складі бактерії виділені з різних еко-

ніш [8]. Такі препарати є універсальними та рекомендовані для різних видів тварин, у тому числі і кролів. Однак відомо, що біологічна активність пробіотичних штамів мікроорганізмів обумовлена джерелом їх виділення. Препарати створені на основі штамів мікроорганізмів з пробіотичними властивостями є більш ефективними для тих видів тварин, від яких були виділені, оскільки такі штами мають видоспецифічні ознаки [9, 10].

Враховуючи вищезазначене, особливості видового та кількісного складу мікробіоти ШКТ певних видів тварин повинні бути враховані на етапі виділення культур мікроорганізмів.

Раніше показано, що чисельність молочнокислих бактерій (МКБ) у ШКТ кролів перевищує чисельність біфідобактерій незалежно від раціону та типу годівлі [11]. Тому, на нашу думку, перспективною групою мікроорганізмів для створення пробіотичного препарату для кролів є саме бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус «Generally recognized as safe» та «Qualified presumption of safety», тобто їх використання є абсолютно безпечним.

У попередніх роботах нами описано виділення та селекція біологічно активних ізолятів МКБ із ШКТ кролів [12, 13], їх вплив на мікробіоту ШКТ [14] та пробіотичні властивості [15]. Однак залишається не вивченою антибіотикорезистентність досліджуваних бактерій. Це питання є дуже важливим, тому що дає змогу використовувати нові штами при проведенні бактеріотерапії без шкоди для здоров'я людини та тварин. Також згідно з європейськими рекомендаціями штами, що пропонуються для використання як основа пробіотичного препарату повинні проходити видову ідентифікацію [16].

3. Мета та задачі дослідження

Мета дослідження – ідентифікація та вивчення стійкості до антибіотиків нових штамів МКБ, виділених зі ШКТ кроля.

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Ідентифікувати до роду ізоляти МКБ, виділені зі ШКТ кролів.
2. Класифікувати за культурально-морфологічними та біохімічними показниками найбільш біологічно активні ізоляти до філогенетичних груп.

3. Дослідити наявність типових генів деяких видів МКБ у найактивнішого ізоляту.

4. Встановити значення мінімальної інгібуючої концентрації антибіотиків досліджуваних ізолятів.

5. Дослідити дисково-дифузним методом антибіотикорезистентність найактивнішого ізоляту.

4. Матеріали та методи дослідження

Як типового представника МКБ використовували штам *L. acidophilus* ССМ 4833, отриманий з депозитарію Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

В роботі були використані МКБ, виділені та селекціоновані зі ШКТ кролів [12]. Визначення належності ізолятів до МКБ проводили за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками, а саме: здатність забарвлюватись за Грамом, форма та розміри клітин, рухливість, наявність каталази, здатність перетворювати нітрати в нітрити, утворювати газ із глюкози [16]. Видову приналежність МКБ попередньо вивчали за спектром зброджування вуглеводів, використовуючи середовища Гісса з додаванням вуглеводів у кількості 2 %.

Молекулярно-генетичну ідентифікацію проводили з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Синтезовані і ліофілізовані в НВФ „ЛИТЕХ” (Росія) олігонуклеотидні праймери (табл. 1) були розведені до концентрації 100 пкм/мкл “Ultra Pure Distilled Water” (Invitrogen, Cat.#10977-023, США) і зберігалися за температури (-20) °С до використання. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на термоциклерах «Герцик» (ДНК-технологія, Росія) та «Т1» (Biometra, Німеччина). Реакцію проводили методом «гарячого» старту в об'ємі 0,025 см³. З метою мінімізації утворення неспецифічних димерів праймер-матриця і їх ампліфікації, був використаний метод приготування реакційної суміші з фізичним розділенням компонентів ПЛР.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили шляхом розділення фрагментів ДНК в 1,5 % гелі агарози (Sigma, США).

Розташування смуг ДНК на отриманій електрофореграмі та їх реєстрацію виконували за допомогою системи гель-документування “Molecular Image GelDoc XR+” (BioRad, США).

Таблиця 1

Праймери, використані у дослідженні

Праймер	Вид мікроорганізмів	Послідовність	Література
Aci I	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	TCTAAGGAAGCGAAGGAT	Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatosava, T. (1997)
Aci II	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CTCTTCTCGGTCGCTCTA	
PeCr	<i>Lactobacillus helveticus</i>	TTTGCCAGCATTAACAAGTCT	Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C., & Manachini, P. L. (2001)
PeCf	<i>Lactobacillus helveticus</i>	CTGTTTTCAATGTTGCAAGTC	

Для найбільш перспективних штамів МКБ визначали чутливість до антибіотиків стандартизованими методами. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) антибіотика проводили на рідкому середо-

вищі MRS з додаванням антибіотиків (ампіцилін, бензилпеніцилін, еритроміцин, тетрациклін, стрептоміцин), фіксуєючи пробірки, у яких повністю відсутній ріст досліджуваних штамів. Посіви інкубували упродовж 48 год

за температури 37 ± 2 °C. Диско-дифузійним методом визначали чутливість до антибіотиків у MRS-агарі з використанням стандартних паперових дисків, які просочені антибіотиками [17]. Інтерпретацію результатів тестування проведено відповідно до літературних джерел [18]. Результати чутливості до антимікробних препаратів оцінювали за діаметрами зон затримки росту досліджуваних штамів, згідно з рекомендаціями виробника дисків. Доводили густину бактеріальної суспензії до показника 1 за стандартом мутності Мак-Ферлана, підготовлені таким чином суспензії досліджуваних ізолятів у кількості $0,1\text{ см}^3$ рівномірно розподіляли стерильним шпателем на поверхні живильного середовища (MRS). Через 20–30 хв після посіву на середовище додавали диски з антибіотиками. Чашки інкубували в анаеробних умовах упродовж 48 год за температури 37 ± 2 °C.

Результати досліджень представлено як середнє значення з поправкою на

стандартну похибку. Статистичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу, використовуючи програму «Microsoft Excel 2010».

5. Результати досліджень та їх обговорення

В лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН нами було виділено 250 бактеріальних ізолятів МКБ з біологічних зразків ШКТ кролів, наданих приватними господарствами після їх забою. За морфологічними ознаками виділені бактерії були паличкоподібні, нерухомі, грампозитивні, різної товщини та довжини, не утворювали спор, клітини розташовувались окремо або ланцюжками. Досліджувані ізоляти не утворювали фермент каталазу та не відновлюють нітратів до нітритів. Хемоорганотрофи: потребують збагачених середовищ для культивування. В агаризованому середовищі MRS вони утворювали колонії білого кольору $1,0\text{--}2,0$ мм у діаметрі у вигляді «човників» або дисків. На рідких живильних середовищах бактерії росли у вигляді рівномірної каламуті та дрібнодисперсного осаду на дні, були факультативними анаеробами. У процесі дослідження встановлено, що загалом температурний діапазон росту виділених ізолятів становив від $+15$ °C до $+45$ °C, а оптимальна температура їх розвитку – (37 ± 2) °C [12]. За фізіолого-біохімічними та морфолого-культуральними ознаками досліджувані ізоляти МКБ були віднесені до бактерій роду *Lactobacillus*.

Відомо, що активність кислотоутворення є одним із суттєвих показників придатності культур МКБ для створення пробіотичних препаратів, оскільки їх антагоністична активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, обумовлена в першу чергу дією органічних кислот, що знижують рН середовища. Також з літературних джерел відомо, що середовище шлунку кролів є більш кислим, ніж у більшості тварин та людини [3]. Враховуючи цей факт, первинний відбір ізолятів проводили за граничним значенням кислотоутворення. Для подальшої роботи було відібрано 10 ізолятів, кислотоутворююча активність яких становила 200 °T або перевищувала даний показник: L-4/1, L-5/4, L-13/2, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3, L-31/2, L-39/2, L-49/1.

Наступним етапом нашої роботи було проведення попередньої ідентифікації досліджуваних ізолятів до виду за біохімічними властивостями. Класифікація, створена на підставі вивчення біохімічних властивостей залишається актуальною і на сьогодні [19, 20]. Важливим для визначення видової приналежності МКБ є вивчення здатності використовувати речовини як єдине джерело вуглецевого живлення (табл. 2). Встановлено, що 40 % досліджуваних ізолятів молочнокислих бактерій, здатні ферментувати арабінозу, дульцит; 50 % – маніт; 70 % – сорбіт; 80 % – манозу, фруктозу; 90 % – лактозу; 100 % – галактозу, мальтозу, сахаразу, глюкозу 20 % – рафінозу. Жоден досліджуваний ізолят МКБ не використовував рамнозу та ксилозу, як єдине джерело Карбону. Відповідно до отриманих результатів, нами попередньо ідентифіковано 10 ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів до філогенетичних груп: L-13/2, L-31/2, L-49/1 – *L. acidophilus*, L-4/1, L-39/2 – *L. lactis*, L-5/4 – *L. casei*, L-16/1, L-16/3, L-17/2, L-17/3 – *L. plantarum*.

Варто зазначити, що філогенетична група *Lactobacillus acidophilus* об'єднує ряд видів: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, які є промислово значущими і на сьогодні широко використовуються в харчовій і фармацевтичній промисловості [21, 22]. З даних літератури відомо, що використання фенотипових ознак не дає змоги чітко провести видову ідентифікацію МКБ [23]. Тому останніми роками все більш загальноживаною стає ідентифікація мікроорганізмів із використанням генетично-молекулярних методів. З появою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стала можливою розробка різних варіантів праймерів для визначення багатьох видів роду *Lactobacillus* на основі будови генів рибосомної РНК. Внаслідок детального аналізу гену 16S-pРНК і 16S-23S спейсерної ділянки було виявлено специфічні відмінності, характерні для різних таксономічних рівнів МКБ: роду, виду, підвиду і штаму.

Даний факт був використаний для конструювання видо- і групспецифічних праймерів для визначення й ідентифікації цих мікроорганізмів. Так, Tilsala-Timisjärvi A. та Alatosava, T [24], Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C. та Manachini, P. L. розробили праймери для визначення видів видів *L. acidophilus* та *L. helveticus*. [25].

Вивчення пробіотичних властивостей бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, показало, що найбільш перспективним для створення пробіотику для кролів є ізолят *Lactobacillus* sp. 13/2 [15]. Тому для молекулярно-генетичних досліджень з використанням видоспецифічних праймерів нами відібрано саме цей ізолят. В контрольному варіанті позитивний результат отримано для типового представника молочнокислих бактерій, що підтвердило його належність до виду *L. acidophilus* (рис. 1). В дослідному варіанті нами встановлено, що досліджуваний ізолят *Lactobacillus* sp. 13/2 (L-13/2) не містить генів, які наявні у більшості видів *L. acidophilus*, *L. helveticus* (рис. 1). Тому його точна видова ідентифікація потребує залучення додаткових методів.

Таблиця 2

Використання досліджуваними ізолятами хімічних речовин як єдиного джерела вуглецю

Джерело Карбону Ізолят	Арабіноза	Галактоза	Дульцит	Лактоза	Мальтоза	Маніт	Манноза	Рамноза	Рафіноза	Сахароза	Сорбіт	Фруктоза	Глюкоза	Ксилоза	Філогенетична група
L-4/1	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>L.Lactis</i>
L-5/4	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. casei</i>
L-13/2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	<i>L. acidophilus</i>
L-16/1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. plantarum</i>
L-16/3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. plantarum</i>
L-17/2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. plantarum</i>
L-17/3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. plantarum</i>
L-31/2	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. acidophilus</i>
L-39/2	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	<i>L.Lactis</i>
L-49/1	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>L. acidophilus</i>

Примітка: + позитивний результат; – негативний результат

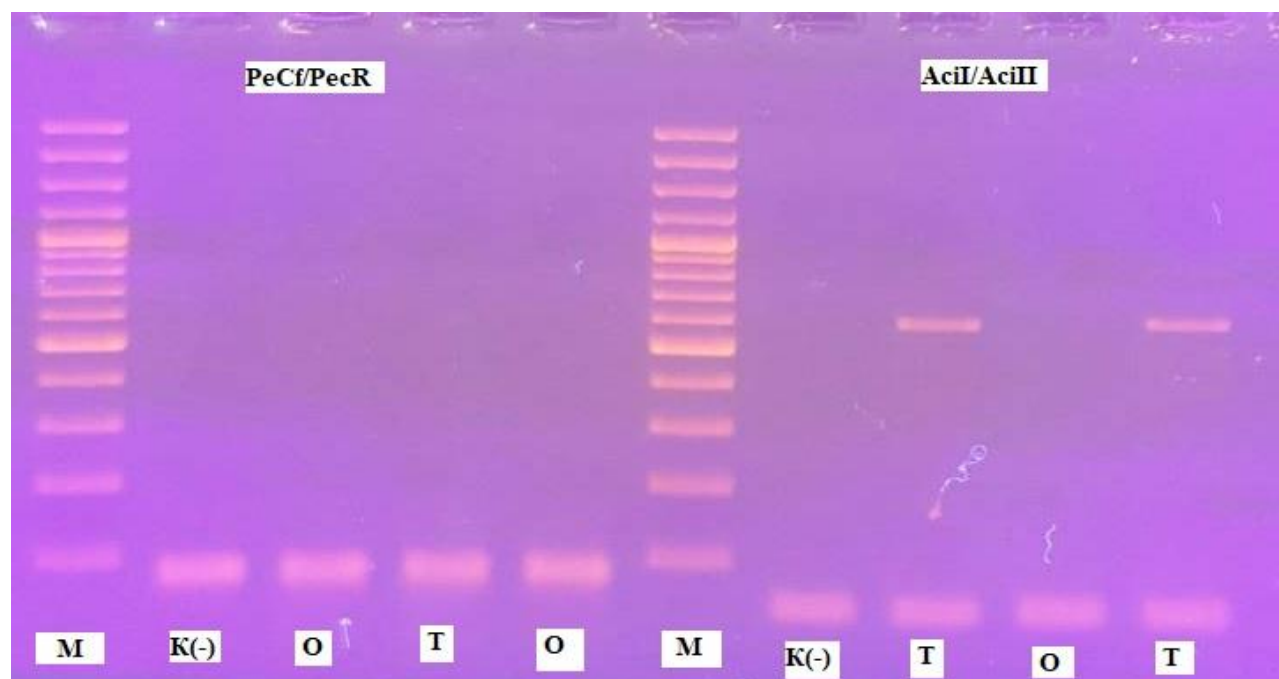


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ампліфікації з праймерами PeCf/PecR та AciI/AciII. Варіанти: М - маркер розмірів фрагментів ДНК "100 bp Plus DNA Ladder" (Thermo Scientific); К(-) – негативний контроль; Т – типовий штам; О – *Lactobacillus* sp. 13/2: Специфічність праймерів до послідовності геномної ДНК бактерій роду *Lactobacillus* показана за допомогою програмного забезпечення "Vector NTI" v.10.0.1 (Invitrogen)

Як зазначалось вище, використання антибіотиків для стимулювання росту продуктивних тварин несе найбільшу загрозу для гуманної медицини через поширення резистентних штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Найкраща альтернатива застосуванню антибіотиків-стимуляторів росту в тваринництві – це загальне поліпшення годівлі та умов утримання тварин, використання пробіотиків.

Однак при селекції штамів пробіотичних мікроорганізмів важливе значення має дослідження їх стійкість до антибіотиків, оскільки, на думку деяких дослідників, МКБ можуть бути здатні до горизонтального переносу до інших мікроорганізмів генів антибіотикорезистентності [26, 27].

Разом з тим, у літературі існують відомості про те, що МКБ не містять плазмідної ДНК, небезпечної для поширення резистентності до антибіотиків серед інших бактерій, так як плазмідні МКБ характеризуються низькою молекулярною масою (менше 10 МД) і не здатні до самостійного переносу [28], що робить можливим їх лікувально-профілактичне використання навіть з наявною антибіотикорезистентністю [29, 30].

Тому нами було досліджено *in vitro* активність антибіотиків щодо перспективних для створення пробіотичного препарату штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з ШКТ кролів. Проведено дослідження з визначення мінімальної інгібуючої концентрації за найменшою кількістю антибіотика, що повністю затримувала ріст мікроорганізмів у живильному середовищі MRS (J.C. De Man, M. Rogosa та E. Sharpe). Результати представлено у табл. 2. Відповідно до наказу МОЗ України за №167 від

05.04.2007р. «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів», встановлено, що досліджувані не перевищували допустимі діапазони значень МІК (мг/л) контрольних штамів мікроорганізмів зі складними поживними потребами [31]. Як свідчать результати проведеної роботи (табл. 3), найменше значення показника МІК встановлено для бензилпеніциліну – 0.01 – 0.50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, залежно від досліджуваного ізоляту. Найвищі рівні МІК отримано для стрептоміцину та ампіциліну – 2,50 – 10,00 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Загалом чутливість досліджуваних ізолятів до антибіотиків мала штамову залежність. Найбільш чутливим до антибіотиків виявився ізолят L-17/3. Значення МІК для всіх антибіотиків використаних у роботі, окрім тетрацикліну, у цього штаму було нижче порівняно з іншими досліджуваними бактеріями. Варто зазначити, що МІК для тетрацикліну суттєво не відрізнялось у всіх досліджуваних ізолятів. Більш високі значення МІК виявлено у ізолятах: L-4/1 – до еритроміцину, L-16/1, L-16/3 та L-17/2 – до ампіциліну.

При вивченні антибіотикорезистентності диско-дифузним методом ізолят *Lactobacillus* sp. 13/2 виявився стійким до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти (табл. 4).

Таким чином, отримані результати показали полірезистентність досліджених ізолятів до антибіотиків. На нашу думку, стійкість відібраних нами ізолятів до антибіотиків потребує більш детального вивчення природи даного явища для виключення можливості горизонтального переносу генів резистентності та підтвердження безпечності їх застосування щодо поширення резистентності до антибіотиків серед інших бактерій.

Таблиця 3

Мінімальна інгібуюча концентрація антибіотика, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (n=3)

Досліджувані штами	Ампіцилін (інгібітор транспептидази, руйнує клітинну стінку)	Бензилпеніцилін (інгібітор синтезу пептидоглікана, руйнує клітинну стінку)	Еритроміцин (інгібує синтез білків)	Тетрациклін (інгібує синтез білків)	Стрептоміцин (інгібує синтез білків)
L.-4/1	2,50–5,00	0,05–0,50	1,00–2,50	1,00–5,00	2,50–5,00
L.-5/4	5,00–7,50	0,10–0,50	0,10–0,50	0,50–2,50	5,00–7,50
L.-13/2	5,00–7,50	0,01–0,05	0,50–1,00	0,50–2,50	5,00–7,50
L.-16/1	7,50–10,00	0,01–0,05	0,10–0,50	1,00–2,50	2,50–5,00
L.-16/3	7,50–10,00	0,10–0,50	0,50–1,00	5,00–7,50	2,50–5,00
L.-17/2	7,50–10,00	0,005–0,010	0,50–2,50	5,00–7,50	5,00–7,50
L.-17/3	1,00–2,50	$\leq 0,005$	0,10–0,50	5,00–7,50	0,50–1,00
L.-31/2	5,00–7,50	0,10–0,50	0,10–0,50	0,50–2,50	2,50–5,00
L.-39/2	5,00–7,50	0,01–0,05	0,50–1,00	5,00–7,50	5,00–7,50
L.-49/1	5,00–7,50	0,10–0,50	0,10–0,50	0,50–2,50	2,50–5,00
<i>L. acidophilus</i> CCM 4833	5,00–7,50	0,01–0,05	0,50–1,00	0,50–2,50	5,00–7,50

Таблиця 4

Антибіотикорезистентність *Lactobacillus* sp. 13/2

Клас антибіотиків	Антибіотик	Концентрація в диску, мкг	Чутливість досліджуваного ізоляту
Інгібітори синтезу клітинної стінки			
β-лактамази	Амоксицилін	10	Ч
	Ампіцилін	10	Ч
	Оксацилін	1	С
Цефалоспорици	Цефалексин	30	Ч
Інгібітори синтезу протейнів			
Аміноглікозици	Гентаміцин	10	П
	Канаміцин	30	С
	Стрептоміцин	10	С
Макроліди	Еритроміцин	10	Ч
Нітрофурани	Нітрофурантоїн	300U	Ч
Тетрацикліни	Тетрациклін	10	Ч
Хлорамфеніколи	Левоміцетин	30	Ч
Інгібітори синтезу нуклеїнових кислот			
Рифампіцици	Рифампіцин	5	Ч
Хінони	Налідиксова кислота	30	С
	Ципрофлоксацин	5	П
Інгібітори функцій ЦПМ			
Поліміксини	Поліміксин-Б	300U	П

Примітка: Ч – чутливий; П – помірно стійкий; С – стійкий

6. Висновки

1. Ідентифіковано до роду *Lactobacillus* 250 ізолятів молочнокислих бактерій, виділених зі ШКТ кролів.

2. За культурально-морфологічними та біохімічними показниками 10 найбільш біологічно активних ізолятів віднесено до філогенетичних груп: *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*.

3. Виявлено, що найперспективніший ізолят

Lactobacillus sp. 13/2 не містить генів, типових для видів *L. acidophilus* та *L. helveticus*.

4. Встановлено низькі значення МІК до ампіциліну, бензилпеніциліну, еритроміцину, тетрацикліну та стрептоміцину для ізолятів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі ШКТ кролів.

5. Виявлено стійкість до оксациліну, канаміцину, стрептоміцину, налідиксової кислоти перспективного ізоляту *Lactobacillus* sp. 13/2.

Література

1. Ковальчук І. І., Ящук І. В. Сучасний стан та перспективи розвитку галузі кролівництва в Україні // Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. 2016. № 5. С. 24–29.
2. Аксьонов С. О. Розвиток кролівництва в Україні та світі // Науково-технічний бюлетень. 2016. № 116. С. 15–21.
3. Stephen W. B., Stephen M. G., Dean H. P. Pathology of laboratory rodents and rabbits. Chichester: John Wiley & Sons, 2016. 372 p.
4. Antimicrobial resistance. WHO, 2017. URL: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/wha70/a70_12-en.pdf
5. WHO Global Strategy for the Containment of Antimicrobial Resistance. WHO, 2001. URL: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf
6. Khachatourians G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria // Canadian Medical Association Journal. 1998. Issue 159. P. 1129–1136.
7. Калачнюк Г. І. Пробиотики у тваринництві // Тваринництво України. 1996. № 5. С. 16–18.
8. Ветеринарний інформаційно-аналітичний ресурс України. URL: <https://vet.in.ua/>
9. Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender / Bernbom N., Norrung B., Saadbye P., Molbak L., Vogensen F. K., Licht T. R. // Journal of Microbiological Methods. 2006. Vol. 66, Issue 1. P. 87–95. doi: <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.014>
10. Тараканов Б. В. Методы исследования микрофлоры пищеварительного тракта сельскохозяйственных животных и птицы. Москва: Научный мир, 2006. 188 с.
11. Особливості кишкового мікробіоценозу молодняка кролів за різних типів годівлі / Похилько Ю. М., Кравченко Н. О., Божок Л. В., Агеев В. О., Дмитрук О. М. // Сільськогосподарська мікробіологія. 2015. № 22. С. 48–52.
12. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Виділення із травної системи кролів молочнокислих бактерій, перспективних для створення пробіотичних препаратів // Біоресурси і природокористування. 2016. № 8 (5-6). С. 63–66.
13. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Стійкість бактерій роду *Lactobacillus* до метаболітів травної системи // Мікробіологія і біотехнологія. 2017. № 2 (38). С. 101–111. doi: [http://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.2\(38\).105019](http://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.2(38).105019)
14. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Відновлення та корекція балансу мікробіоти шлунково-кишкового тракту кролів, порушеного внаслідок введення антибіотиків // Біоресурси і природокористування. 2018. № 10 (3-4). С. 19–31. doi: <http://doi.org/10.31548/bio2018.03.003>
15. Похилько Ю. М., Кравченко Н. О. Пробиотичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, виділених зі шлунково-кишкового тракту кроликів // Біологічні Студії. 2018. № 12 (1). С. 35–46. doi: <http://doi.org/10.30970/sbi.1201.535>

16. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3 / De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H., Whitman W. D. New York: Springer, 2009. 1422 p.
17. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках: учебник. Москва: Высшая школа, 1986. 448 с.
18. Dec M., Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* strains isolated from domestic geese // *British Poultry Science*. 2015. Vol. 56, Issue 4. P. 416–424. doi: <http://doi.org/10.1080/00071668.2015.1058919>
19. Comparative genomics of the lactic acid bacteria / Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E. et. al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, Issue 42. P. 15611–15616. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
20. Oren A., Garrity G. M. Notification that new names of prokaryotes, new combinations, and new taxonomic opinions have appeared in volume 68, part 1, of the *IJSEM* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2018. Vol. 68, Issue 4. P. 979–981. doi: <http://doi.org/10.1099/ijsem.0.002597>
21. Marhamatizadeh M. H., Sayyadi S. Mining of lactic acid bacteria from traditional yogurt (Mast) of Iran for possible industrial probiotic use // *Italian Journal of Animal Science*. 2019. Vol. 18, Issue 1. P. 663–667. doi: <http://doi.org/10.1080/1828051x.2018.1552541>
22. Identification, characterization, immobilization, and mutational analysis of a novel acetyltransferase with industrial potential (La AcE) from *Lactobacillus acidophilus* / Wang Y., Ryu B. H., Yoo W., Lee C. W., Kim K. K., Lee J. H., Kim T. D. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2018. Vol. 1862, Issue 1. P. 197–210. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.10.008>
23. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA / Tamminen M., Joutsjoki T., Sjoblom M., Joutsen M., Palva A., Ryhanen E.-L., Joutsjoki V. // *Letters in Applied Microbiology*. 2004. Vol. 39, Issue 5. P. 439–444. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01607.x>
24. Tilsala-Timisjärvi A., Alatosava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR // *International Journal of Food Microbiology*. 1997. Vol. 35, Issue 1. P. 49–56. doi: [http://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)88066-x](http://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)88066-x)
25. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers / Fortina M. G., Ricci G., Mora D., Parini C., Manachini P. L. // *FEMS Microbiology Letters*. 2001. Vol. 198, Issue 1. P. 85–89. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10623.x>
26. Ashraf R., Shah N. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products // *International Food Research Journal*. 2011. Vol. 18, Issue 3. P. 837–853.
27. Hughes P., Heritage J. Antibiotic growth-promoters in food animals // *FAO Animal Production and Health Paper*. 2004. P. 129–152.
28. Шендеров Б. А. Пробиотики и функциональное питание. Москва: Грантъ, 2001. 288 с.
29. Gradient Diffusion Antibiotic Susceptibility Testing of Potentially Probiotic *Lactobacilli* / Charteris W. P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. // *Journal of Food Protection*. 2001. Vol. 64, Issue 12. P. 2007–2014. doi: <http://doi.org/10.4315/0362-028x-64.12.2007>
30. Shah N. P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods // *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83, Issue 4. P. 894–907. doi: [http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(00\)74953-8](http://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(00)74953-8)
31. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5 – 143 / ред. Некрасова Л. С., Свита В. М., Глушкевич Т. Г., Томчук В. В., Жеребко Н. М., Покас О. В. Київ: МОЗ України, 2007. 74 с.

Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Надкернична О. В.

Received date 26.03.2019

Accepted date 12.04.2019

Published date 30.04.2019

Похилько Юрій Миколайович, аспірант, Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, вул. Шевченко, 97, м. Чернігів, Україна, 14027
E-mail: pohilko.yura@gmail.com

Кравченко Наталія Олександрівна, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії, Лабораторія пробіотиків, Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН, вул. Шевченко, 97, м. Чернігів, Україна, 14027
E-mail: nat.probiotic@gmail.com