

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *BACILLUS*

Шкромата Оксана Іванівна

доктор ветеринарних наук, професор  
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)  
ORCID: 0000-0003-1751-7009  
oshkromada@gmail.com

Дудченко Юлія Андріївна

аспірант  
Сумський національний аграрний університет (м. Суми, Україна)  
ORCID:0000-0001-9243-8621  
dudchenko.yulia@ukr.net

Невиправдане та неконтрольоване використання протимікробних препаратів у тваринництві може призвести до збільшення антибіотикорезистентності та вплинути на здоров'я тварин та людей. Дослідження проводились у господарстві з вирощування великої рогатої породи голштин худоби України ТОВ агрофірма «Лан» у період березень-квітень 2021 року. Проводили моніторинг мікроорганізмів у господарстві, визначали їх кількість і видову належність. В якості елективного середовища для *Escherichia* використовували агар Ендо; визначення *Staphylococcus aureus* проводили на агарі Чистовича, визначення грибів та дріжджів – на агарі Сабуро. Застосовували полімеразну ланцюгову реакцію для визначення *Mycoplasma* spp.. Також визначали антагоністичні властивості пробіотичних штамів *Bacillus* методом дифузії в агарові лунки. Визначали розмір зони затримки росту у мм навколо різних штамів: *Bacillus amyloliquefaciense* NR 59, *Bacillus mucilaginosus* ACH 82, *Bacillus coagulans* ALM86, *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus pumilus* LA 56 в розведенні  $1 \times 10^9$ , КУО/г. В якості контролю використовували диски з антибіотиком цефалексином. В кожну лунку з м'ясо-пептонним агаром з відповідним ізолятом вливали відповідний штам пробіотичного мікроорганізму. Далі проводили інкубацію протягом 24 годин за температури 37 °C та визначали демаркаційну зону навколо кожної лунки. Визначені основні збудники захворювань молочних телят на фермі: *S. agalactiae* (23 %), *S. aureus* (11 %), *S. epidermidis* (18 %), *E. fecalis* (10 %), *E. coli* (12 %), *Mycoplasma* spp. (7 %), гриби *Candida* (9 %) та асоційована мікрофлора (10 %). Визначено три пробіотичних штамів мікроорганізмів, до яких проявили найбільшу чутливість мікроорганізми ізолювані у приміщенні телятника. Встановлено, що *Bacillus coagulans* ALM 86 проявляв антагоністичні властивості більше порівняно з антибіотиком стосовно *S. agalactiae* – на 18,93 %; *Candida* – на 29,16 %; *S. aureus* – на 15,56 %. Штам *Bacillus pumilus* LA 56 пригнічує більше ніж цефалексин ріст колоній *S. epidermidis* на 20,49 %; *E. coli* 28,78 %; *Candida* – на 7,33 %. *B. megaterium* NCH 55 проявляв протимікробні властивості до *S. aureus* та *E. fecalis* однаково з антибіотиком цефалексином. В результаті проведених досліджень визначені пробіотики, які можуть стати альтернативою для заміни антибіотиків. Перспективою подальших досліджень у цьому напрямку є визначення механізму дію пробіотиків *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus coagulans* ALM 86 та *Bacillus pumilus* LA 56 на патогенні мікроорганізми та визначення терапевтичного ефекту на тварин.

**Key words:** телята, бактеріальний антагонізм, антибіотикорезистентність, *B. amyloliquefaciense*, *B. mucilaginosus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. pumilus*.

DOI <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2021.4.6>

**Вступ.** Основними завданнями ефективного тваринництва є: отримання максимального продуктивності і високої збереженості поголів'я; виробництво високоякісних і безпечних для харчування людини продуктів; зниження собівартості продукції тваринництва; забезпечення екологічної безпеки виробництва (Calvo-Lorenzo et al., 2016).

Разом з тим сільгоспвиробники стикаються з проблемами, пов'язаними з безпекою молодняку сільськогосподарських тварин, які викликані із захворюваннями шлунково-кишкового тракту. Слід зазначити, що хвороби шлунково-кишкового тракту займають друге місце після вірусних і є основною причиною загибелі молодняку (Rybachuk et al., 2020).

Хвороби шлунково-кишкового тракту пов'язані з порушенням кишкового мікробіома і зниженням резистентності, обумовлені ослабленням імунної системи на яку впливають: висока концентрація поголів'я на обмежених

територіях; технологічні стреси; погіршення технології; широке використання антибактеріальних препаратів; дезінфекція та ін. (Govender et al., 2014).

Серед актуальних ветеринарних проблем в тваринництві є діарея у молодняку сільськогосподарських тварин. Почастішали випадки загибелі молодняку, викликані дисбактеріозом (Ruiz et al., 2011). Дисбактеріоз - це якісні і кількісні зміни мікробіома в результаті зміни захисних механізмів, що виконують бар'єрну функцію кишечника.

Дисбактеріоз розвивається внаслідок пригнічення молочнокислої мікрофлори товстого кишечника. Причинами цього можуть бути інфекційні захворювання. Збудники кишкових інфекцій виділяють отруйні речовини, які пригнічують життєдіяльність корисної мікрофлори (Kong et al., 2019). Розвивається діарея, з якої молочнокислі бактерії виводяться з травного тракту.

Захворювання або неправильне харчування матерів. У годуючих самок може виникнути мастит (Shkromada et

al., 2019). З таким молоком в організм дитинчати проникають хвороботворні бактерії. При незбалансованому або убогому годуванні, використанні зіпсованих компонентів з молоком виділяються токсичні для телят речовини.

У перші дні життя теля повністю залежить від рідкого корму, що складається з молока або замінників молока. Споживання інших кормів зазвичай починається приблизно з 1-тижневого віку, і внесок цього типу корму збільшується з часом до моменту відлучення. Тривалість згодовування телят молока залежить від типу господарювання на фермі. У виробництві телят рідкі корми використовують протягом усього життя тварин. Телят, вирощених як заміна молочного стада або для виробництва яловичини, зазвичай відлучають від матері у віці 6–10 тижнів. Швидкий перехід з молока на замінники може викликати у телят розлад шлунково-кишкового тракту і зниження резистентності організму (Manui-Loh et al. 2018).

В цей період дуже бажано підтримати організм молодняка задаванням пробіотичних штамів мікроорганізмів (Izuddin et al., 2020).

При народженні кишковий тракт телят містить лише дуже обмежену кількість бактерій. Після народження швидко відбувається колонізація бактеріями з навколишнього середовища. Протягом перших кількох днів і тижнів більша частина молока проходить у сичуг забезпечуючи ефективне травлення та поглинання поживних речовин. Лише невелика частина молока потрапляє до рубця, який тільки розвивається (Ozutsumi et al., 2005; Mao et al., 2012).

Створення мікробної спільноти в рубці має важливе значення для росту і благополуччя теляти. Крім того, з'являються докази того, що мікробна спільнота, яка розвивається в ранньому віці, визначає подальшу мікробну спільноту дорослого рубця (Yáñez-Ruiz et al., 2015), що має наслідки для здоров'я та продуктивності в подальшому житті.

Дуже важливо забезпечити правильний поступовий перехід від рідкого корму до грубих кормів. У деяких господарствах для підтримки роботи рубця його заселяють мікрофлорою шляхом інокуляції теляті свіжою рідиною рубця від дорослих тварин. Це прискорює мікробну колонізацію рубця, яка була пов'язана з більш раннім функціональним розвитком рубця. Ця стратегія сприяла більш плавному переходу від молока до твердого корму, покращуючи продуктивність тварин під час відлучення та мінімізуючи стрес (Palma-Hidalgo et al., 2021).

Однак такий шлях є трудомістким та не гарантує потрапляння до організму теляти разом з корисною мікрофлорою рубця патогенних мікроорганізмів. Проблема полягає в тому що дуже часто дорослі тварини носіями бактеріальних хвороб і не проявляють ознак захворювання. Телята є дуже сприйнятливими до бактеріальних патогенів і можуть захворіти.

Результати (Maier et al., 2019) свідчать про те, що утримання і методи годівлі телят можуть бути найважливішою областю, пов'язаною з поширеністю респіраторних захворювань у молодих молочних телят на молочних

підприємствах. Пастеризація молока, годування товарним молоком, годування телят понад 5,68 л молока або замінника на день може бути причиною розвитку респіраторних захворювань.

У 2010 році респіраторні захворювання у молочних телиць були причиною 22,5% смертей до і 46,5% смертей після відлучення. Крім того, повідомляється, що 18,1% телиць перед відлученням на молочних теликах постраждали від пневмонії, що робить це другим за поширеністю захворювання телят після діареї (Guterbock, 2014). Таким чином, протягом останніх кількох десятиліть не було зареєстровано жодного покращення рівня захворюваності серед молочних телят.

Оскільки частота захворюваності у телят на діарею та респіраторні захворювання дуже висока, а умови утримання та годівлі не завжди відповідають нормам, у господарствах часто застосовують антибіотики для контролю бактеріальних захворювань. Безконтрольне використання антибіотиків призводить до виникнення антибіотикорезистентності (Cheng et al., 2014) та забруднення навколишнього середовища.

Для зменшення застосування антибіотиків та збільшення шансів у телят на виживання можна використовувати пробіотики (Mingmongkolchai et al., 2018; Wu et al., 2014).

**Мета роботи:** провести моніторинг збудників захворювань телят та визначити ступінь антагонізму пробіотичних штамів мікроорганізмів до виділених ізолятів.

#### **Матеріали і методи досліджень.**

Дослідження проводились у господарстві з вирощування великої рогатої породи голштин худоби України ТОВ агрофірма «Лан» у період березень-квітень 2021 року відповідно до директиви 2010/63/ЄС (Hartung, 2010), які затверджені висновком комісії з питань етики та біоетики факультету ветеринарної медицини Сумського національного аграрного університету від 02.12.2021 року.

Для проведення моніторингу мікроорганізмів у господарстві застосовували бактеріальний метод і визначали їх кількість і видову належність. В якості елективного середовища для *Escherichia* використовували агар Ендо; визначення *Staphylococcus aureus* проводили на агарі Чистовича, визначення грибів та дріжджів – на агарі Сабуро. Застосовували полімеразну ланцюгову реакцію для визначення *Mycoplasma spp.*

**Визначення антагоністичних властивостей пробіотичних штамів *Bacillus*.** Визначали методом дифузії в агарові лунки. Визначали розмір зони затримки росту у мм навколо різних штамів: *Bacillus amyloliquefaciense* NR 59, *Bacillus mucilaginosus* ACH 82, *Bacillus coagulans* ALM86, *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus pumilus* LA 56 в розведенні  $1 \times 10^9$ , КУО/г. В якості контролю використовували диски з антибіотиком цефалексином. (Garkavenko et al., 2021). В кожному лунку з м'ясо-пепетонним агаром з відповідним ізолятом вливали відповідний штам пробіотичного мікроорганізму. Далі проводили інкубацію протягом 24 годин за температури 37 °С та визначали демаркаційну зону навколо кожної лунки. Штами пробіотичних мікроорганізмів депоновані і виробляються фірмою «Кронос Агро» Україна.

**Результати.** Тварини разом з видихальним повітрям, фекальними масами та сечею виділяють у зовнішнє середовище тисячі мікроорганізмів, серед яких можуть бути збудники захворювань. Найбільш чутливі телята молочного періоду до хвороб дихальних шляхів та шлунково-шлункового тракту. Через несформовану імунну систему молодняк дуже чутливий до патогенних мікроорганізмів. Виробники продукції намагаються захистити телят за рахунок застосування вакцинації та колострального імунітету. Однак ці заходи не дають абсолютного захисту. Крім того, в корівнику у повітрі та на огорожувальних конструкціях міститься велика кількість мікроорганізмів, яка циркулює і передається з потоком повітря від однієї тварини до іншої. Тому є високі ризики що до захворювань телят і необхідність їх лікування. Для визначення основних збудників захворювань у телятнику був проведений моніторинг у господарстві з вирощуванням великої рогатої худоби (рис.1).

Проби для мікробіологічних досліджень були отримані з повітря тваринницьких приміщень, огорожувальних конструкцій, годівниць, шкіри тварин, зразках фекальних мас та сечі. Як бачимо з отриманих даних визначено, що основними збудниками захворювань молодняка великої рогатої худоби є *S. agalactiae* (23 %), *S. aureus* (11 %), *S. epidermidis* (18 %), *E. fecalis* (10 %), *E. coli* (12 %), *Mycoplasma spp.* (7 %), гриби *Candida* (9 %) та асоційована мікрофлора (10 %).

В результаті проведених мікробіологічних досліджень можна зробити висновок, що бактеріальний тиск на телят є достатньо високим, як і ризики виникнення захворювань. Лікування бактеріальних та грибкових захворювань передбачає використання антибіотиків, що є небажаним для тваринництва в цілому. Крім того, використання хімотерапевтичних протимікробних препаратів

для молодняка, у якого не сформований імунітет і рубцева мікробіота може призвести до загибелі тварин від дисбактеріозу. Одним недоліків антибіотиків є знищення всіх мікроорганізмів у організмі тварини, включаючи корисну мікрофлору. При вирощуванні молочних телят є важливим завданням раннього формування мікробіоти рубця і почати рубцевого травлення. Тому в дослідженні як альтернативу антибіотикам використовували пробіотичні штами *Bacillus*.

Для визначення чутливості мікроорганізмів, які були ізолювані у телятнику, обрали п'ять штамів *Bacillus*, які мають різні властивості (табл.).

За результатами проведених мікробіологічних досліджень встановлено, що

*Bacillus coagulans* ALM 86 проявляв антагоністичні властивості стосовно *S. agalactiae* на 18,93 % більше, порівняно з антибіотиком цефалексином. Колонії *S. aureus* проявляли чутливість до *B. Megaterium* NCH 55 однаково з антибіотиком, *B. Coagulans* ALM 86 – на 15,56 % більше. Штам *Bacillus pumilus* LA 56 пригнічував ріст колоній *S. epidermidis* на 20,49 % більше ніж цефалексин. Пробиотичний мікроорганізм *Bacillus megaterium* NCH 55 проявляв антагонізм стосовно *E. fecalis* на тому ж рівні що і антибіотик. Навколо *Bacillus pumilus* LA 56 зона затримки росту *E. coli* була більше на 28,78 %, порівняно з контролем. Дріжджові гриби роду *Candida* проявили більшу чутливість стосовно *Bacillus pumilus* LA 56 – на 7,33 %, та до *Bacillus coagulans* ALM 86 – на 29,16 %, порівняно з антибіотиком. Таким чином, визначено три пробіотичних штамів мікроорганізмів, до яких проявили найбільшу чутливість мікроорганізми ізолювані у приміщенні телятника. Тому у подальших дослідженнях з телятами, очевидно, буде досліджений терапевтичний ефект *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus coagulans* ALM 86 та *Bacillus pumilus* LA 56.



Рис. Мікроорганізми ізолювані у приміщенні для утримання телят

Результати визначення антагоністичних властивостей пробіотичних штамів *Bacillus*, ( $M \pm m$ ),  $n=5$ 

Культури виділених мікро-організмів	Розведення культури					
	Цефалексин	<i>B. amylolique-faciense</i> NR 59	<i>B. mucilaginosus</i> ACH 82	<i>pumilus</i> LA 56	<i>B. megaterium</i> NCH 55	<i>B. coagulans</i> ALM86
	Зона затримки росту, мм					
<i>S. agalactiae</i>	30,15±0,25	15,46±0,06	6,18±0,07	18,35±0,34	28,56±0,39	35,86±0,43*
<i>S. aureus</i>	40,24±0,34	5,28±0,04	10,13±0,10	25,47±0,31	40,73±0,29	46,50±0,19*
<i>S. epidermidis</i>	35,27±0,50	10,48±0,27	24,57±0,22	42,50±0,56*	18,36±0,23	25,40±0,20
<i>E. fecalis</i>	40,23±0,29	4,74±0,03	5,89±0,07	12,50±0,10	40,34±0,54	26,35±0,22
<i>E. coli</i>	35,12±0,83	20,12±0,25	12,36±0,08	45,23±0,51	27,45±0,67	19,89±0,15
<i>Candida</i>	23,46±0,60	2,40±0,04	5,60±0,09	25,18±0,22	18,52±0,21	30,30±0,12*

Примітка: \* -  $P \leq 0,05$  порівняно з антибіотиком цефалексин

### Обговорення.

Вирощування молодняка великої рогатої худоби є складним завданням для виробників. Створення оптимальних умов утримання для тварин є одним з перших пріоритетів. Проведення моніторингу циркуляції мікроорганізмів у приміщенні телятника показало наявність стрептококів та стафілококів. Збільшення стафілококів у тваринницьких приміщеннях є негативним сигналом для ветеринарних лікарів, так як доведена його патогенна роль як збудника кишкових інфекцій у молодняка (Benedictus et al., 2019) та маститу у корів (da Silva Duarte et al., 2020). Експериментальний бактеріальний лізат, що складався з термічного вбитих та оброблених ультразвуком *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli* викликав у телят ознаки запалення легень та загальну реакцію організму (Bassel et al., 2020). Крім того, визначено, що *Staphylococcus aureus* у 67–73 % та *Streptococcus agalactiae* у 20 % були причиною маститу корів (Shkromada et al., 2019). Як відомо, годівля телят молоком мастичних корів викликає ураження шлунково-кишкового тракту (Köllmann et al., 2021).

Також лабораторними дослідженнями доведено, що пневмонію у тварин викликають мікроскопічні грибки (Evans et al., 2010).

Через високий ступінь захворюваності телят виникає необхідність у застосуванні антибіотиків. Невиправдане та неконтрольоване використання антибіотиків призводить до виникнення антибіотикорезистентності у мікроорганізмів. Встановлено, що стафілокок проявляє найбільшу стійкість до ампіциліну, порівняно з іншими мікроорганізмами (Tanih et al., 2015). Також було визначено (Ricci et al., 2017), що годівля телят молозивом від корів, які отримували пеніциліни та аміноглікозиди призводить до виникнення стійких форм *Escherichia coli*. Також викликає велике занепокоєння те, що застосування, типи та спосіб дії антибіотиків, які використовуються в сільському господарстві та ветеринарній практиці, тісно пов'язані або однакові (які можуть належати до тих самих загальних класів, функціонувати та діяти подібним чином) до тих, які призначаються людям (Islam et al., 2016).

Тому для зменшення використання у тваринництві антибіотиків ведуться пошуки альтернативних методів профілактики та лікування інфекційних захворювань, викликаних бактеріями та мікроскопічними грибами. Проведені дослідження підтвердили наявність бактеріального антагонізму у пробіотичних штамів *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus coagulans* ALM 86 та *Bacillus pumilus* LA 56 до мікроорганізмів, які були ізольовані у приміщенні для утримання телят. Аналогічні результати отримані (Nguyen & Thu, 2015) при дослідженні антимікробної активності *B. megaterium* стосовно *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sciuri*, *Micrococcus luteus*. Також дослідження (Haldar & Gandhi, 2016) показали, що пероральне введення штамів *B. coagulans* B37 або *B. pumilus* B9 може бути корисним для зниження кількості колиформної палички, що супроводжується одночасним збільшенням кількості лактобактерій у кишковій флорі у щурів.

Позитивний протимікробний ефект, який був отриманий у дослідженні може відрізнитись від результатів проведених на інших фермах та інших видах тварин та вікових груп. Кожен мікроорганізм проявляє або не проявляє чутливість до певних груп антибіотиків, які виробляються пробіотичними штамми *Bacillus*. Тому у дослідженні були використані п'ять видів пробіотиків, для визначення максимально вираженого бактеріального антагонізму для конкретних ізолятів мікроорганізмів на фермі. Також іще не повністю зрозумілий механізм дії цих пробіотиків на мікроорганізми.

### Висновки

Визначені основні збудники захворювань молочних телят на фермі: *S. agalactiae* (23 %), *S. aureus* (11 %), *S. epidermidis* (18 %), *E. fecalis* (10 %), *E. coli* (12 %), *Mycoplasma spp.* (7 %), гриби *Candida* (9 %) та асоційована мікрофлора (10 %). За результатами проведених мікробіологічних досліджень встановлено, що *Bacillus coagulans* ALM 86 проявляв антагоністичні властивості більше порівняно з антибіотиком стосовно *S. agalactiae* – на 18,93 %; *Candida* – на 29,16 %; *S. aureus* – на 15,56 %. Штам *Bacillus pumilus* LA 56 пригонічував більше ніж цефалексин ріст колоній *S. epidermidis* на 20,49 %; *E. coli*



28,78 %; *Candida* – на 7,33 %. *B. Megaterium* NCH 55 проявляв протимікробні властивості до *S. aureus* та *E. fecalis* однакову з антибіотиком цефалексином. В результаті проведених досліджень визначені пробіотики, які можуть стати альтернативою для заміни антибіотиків.

Перспективою подальших досліджень у цьому напрямку є визначення механізму дію пробіотиків *Bacillus megaterium* NCH 55, *Bacillus coagulans* ALM 86 та *Bacillus pumilus* LA 56 на патогенні мікроорганізми та визначення терапевтичного ефекту на тварин.

#### Бібліографічні посилання:

1. Bassel, L. L., Co, C., Macdonald, A., Sly, L., McCandless, E. E., Hewson, J., Tiwari, R., Sharif, S., Siracusa, L., Clark, M. E., & Caswell, J. L. (2020). Pulmonary and systemic responses to aerosolized lysate of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in calves. *BMC veterinary research*, 16(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02383-7>
2. Benedictus, L., Ravesloot, L., Poppe, K., Daemen, I., Boerhout, E., van Strijp, J., Broere, F., Rutten, V., Koets, A., & Eisenberg, S. (2019). Immunization of young heifers with staphylococcal immune evasion proteins before natural exposure to *Staphylococcus aureus* induces a humoral immune response in serum and milk. *BMC veterinary research*, 15(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1765-9>
3. Calvo-Lorenzo, M. S., Hulbert, L. E., Fowler, A. L., Louie, A., Gershwin, L. J., Pinkerton, K. E., Ballou, M. A., Klasing, K. C., & Mitloehner, F. M. (2016). Wooden hutch space allowance influences male Holstein calf health, performance, daily lying time, and respiratory immunity. *Journal of dairy science*, 99(6), 4678–4692. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10888>
4. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L. and Yuan, Z. (2014) Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front Microbiol* 5, 69– 83. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>
5. da Silva Duarte, V., Treu, L., Sartori, C., Dias, R. S., da Silva Paes, I., Vieira, M. S., Santana, G. R., Marcondes, M. I., Giacomini, A., Corich, V., Campanaro, S., da Silva, C. C., & de Paula, S. O. (2020). Milk microbial composition of Brazilian dairy cows entering the dry period and genomic comparison between *Staphylococcus aureus* strains susceptible to the bacteriophage vB\_SauM-UFV\_DC4. *Scientific reports*, 10(1), 5520. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62499-6>
6. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Kuile, B. T., Threlfall, J., ... Herman, L. (2017). Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 15(1), e04665. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4665>
7. Evans, S. E., Scott, B. L., Clement, C. G., Larson, D. T., Kontoyiannis, D., Lewis, R. E., Lasala, P. R., Pawlik, J., Peterson, J. W., Chopra, A. K., Klimpel, G., Bowden, G., Höök, M., Xu, Y., Tuvim, M. J., & Dickey, B. F. (2010). Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(1), 40–50. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0260OC>
8. Garkavenko, TO, Gorbatyuk, OI, Kozytska, TG, Anriashchuk, VO, Garkavenko, VM, Dybkova, SM, Azirkina IM (2021) Methodical recommendations for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs, K.: DNDILVSE, 101.
9. Govender, M., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., van Vuuren, S., & Pillay, V. (2014). A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*, 15(1), 29–43. <https://doi.org/10.1208/s12249-013-0027-1>
10. Guterbock W. M. (2014). The impact of BRD: the current dairy experience. *Animal health research reviews*, 15(2), 130–134. <https://doi.org/10.1017/S1466252314000140>
11. Haldar, L., & Gandhi, D. N. (2016). Effect of oral administration of *Bacillus coagulans* B37 and *Bacillus pumilus* B9 strains on fecal coliforms, *Lactobacillus* and *Bacillus* spp. in rat animal model. *Veterinary world*, 9(7), 766–772. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.766-772>
12. Hartung, T. (2010). Comparative analysis of the revised Directive 2010/63/EU for the protection of laboratory animals with its predecessor 86/609/EEC – a t4 report. *ALTEX*, 27(4), 285-303. doi: 10.14573/altex.2010.4.285
13. <http://www.vetlabresearch.gov.ua/derzhavni-zakupivli/docs/%D0%90%D0%BD%D1%82%D0%B8%D0%B1%D1%96%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BD%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C.pdf>
14. Islam, K. S., Shiraj-Um-Mahmuda, S., & Hazzaz-Bin-Kabir, M. (2016). Antibiotic usage patterns in selected broiler farms of Bangladesh and their public health implications. *Journal of Public Health in Developing Countries*, 2(3), 276-284 <https://www.jphdc.org/index.php/jphdc/article/view/84>
15. Izuddin, W. I., Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., & Samsudin, A. A. (2020). Dietary Postbiotic *Lactobacillus plantarum* Improves Serum and Ruminal Antioxidant Activity and Upregulates Hepatic Antioxidant Enzymes and Ruminal Barrier Function in Post-Weaning Lambs. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(3), 250. <https://doi.org/doi.org/10.3390/antiox9030250>
16. Köllmann, K., Wente, N., Zhang, Y., & Krömker, V. (2021). Investigations on Transfer of Pathogens between Foster Cows and Calves during the Suckling Period. *Animals : an open access journal from MDPI*, 11(9), 2738. <https://doi.org/10.3390/ani11092738>
17. Kong, L., Yang, C., Dong, L., Diao, Q., Si, B., Ma, J., & Tu, Y. (2019). Rumen Fermentation Characteristics in Pre- and Post-Weaning Calves upon Feeding with Mulberry Leaf Flavonoids and *Candida tropicalis* Individually or in Combination as a Supplement. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9(11), 990. <https://doi.org/10.3390/ani9110990>
18. Maier, G. U., Love, W. J., Karle, B. M., Dubrovsky, S. A., Williams, D. R., Champagne, J. D., Anderson, R. J., Rowe, J. D., Lehenbauer, T. W., Van Eenennaam, A. L., & Aly, S. S. (2019). Management factors associated with bovine respiratory disease in preweaned calves on California dairies: The BRD 100 study. *Journal of dairy science*, 102(8), 7288–7305. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14773>

19. Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
20. Mao, S., Zhang, R., Wang, D., & Zhu, W. (2012). The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC veterinary research*, 8, 237. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-237>
21. Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology*, 124(6), 1334–1346. <https://doi.org/10.1111/jam.13690>
- a. Nguyen, Tu HK., Thu, Le B. (2015). Evaluation of antimicrobial activities of Bacillus megaterium with a third-generation cephalosporin (ceftriaxone). 5 (09):016-020.10.7324/JAPS.2015.50903[https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1616\\_pdf.pdf](https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/1616_pdf.pdf)
22. Ozutsumi, Y., Hayashi, H., Sakamoto, M., Itabashi, H., & Benno, Y. (2005). Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(9), 1793–1797. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1793>
23. Palma-Hidalgo, J. M., Jiménez, E., Popova, M., Morgavi, D. P., Martín-García, A. I., Yáñez-Ruiz, D. R., & Belanche, A. (2021). Inoculation with rumen fluid in early life accelerates the rumen microbial development and favours the weaning process in goats. *Animal microbiome*, 3(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00073-9>
24. Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & nutrition*, 6(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0207-5>
25. Rybachuk, Z., Shkromada, O., Predko, A., & Dudchenko, Y. (2020). Influence of probiotics “Immunobacterin-D” on biocenoses and development of the gastrointestinal tract of calves. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 22(98), 22-27. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9804>
26. Shkromada O., Skliar O., Paliy A., Ulko L., Gerun I., Naumenko O., Ishchenko K., Kysterna O., Musiienko O., Paliy A., 2019. Development of measures to improve milk quality and safety during production. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 3/11(99), 30-39. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.168762>
27. Shkromada, O., Skliar, O., Pikhtirova, A. & Inessa, G. (2019). Pathogens Transmission and Cytological Composition of Cow's Milk. *Acta Veterinaria Eurasia*, 45 (3) , 73-79 . <https://dergipark.org.tr/tr/pub/actavet/issue/50595/608279>
28. Tanih, N. F., Sekwadi, E., Ndip, R. N., & Bessong, P. O. (2015). Detection of pathogenic Escherichia coli and Staphylococcus aureus from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 195972. <https://doi.org/10.1155/2015/195972>
29. Wu, H.J., Sun, L.B., Li, C.B., Li, Z.Z., Zhang, Z., Wen, X.B., Hu, Z., Zhang, Y.L. (2014) Enhancement of the immune response and protection against Vibrio parahaemolyticus by indigenous probiotic Bacillus strains in mud crab (Scylla paramamosain). *Fish Shellfish Immunol* 41, 156– 162. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.027>
30. Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L., & Newbold, C. J. (2015). Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 1133. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01133>

**Shkromada O. I.**, Dr. Vet. Sciences, Professor, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

**Dudchenko Yu. A.**, PhD student, Sumy National Agrarian University, Sumy, Ukraine

#### **Study of antimicrobial activity of probiotic strains of bacillus**

*Improper and uncontrolled use of antimicrobials in livestock can lead to increased antibiotic resistance and affect animal and human health. The research were conducted in the farm of Holstein cattle LLC AF “Lan” Ukraine in March-April 2021. We monitored microorganisms on the farm, determined their number and species. Endo agar was used as the elective medium for Escherichia; Staphylococcus aureus was determined on Chistovich's agar, and fungi and yeast were determined on Saburo's agar. Polymerase chain reaction was used to determine Mycoplasma spp.. Antagonistic properties of probiotic strains of Bacillus spp. by diffusion into agar wells were also determined. The size of growth inhibition zone around different strains was determined in mm: Bacillus amyloliquefaciense NR 59, Bacillus mucilaginosus ACH 82, Bacillus coagulans ALM86, Bacillus megaterium NCH 55, Bacillus pumilus LA 56 in a dilution of 1 × 10<sup>9</sup> CFU/g. Disks with the antibiotic cephalaxin were used as control. An appropriate strain of probiotic microorganism was poured into each well of meat-peptone agar with the appropriate isolate. Then incubated for 24 hours at 37 °C and determined the demarcation zone around each well. The main pathogens of dairy calves on the farm are identified: S. agalactiae (23 %), S. aureus (11 %), S. epidermidis (18 %), E. fecalis (10 %), E. coli (12 %), Mycoplasma spp. (7 %), fungi Candida (9 %) and associated microflora (10 %). Three probiotic strains of microorganisms were identified, to which microorganisms which were isolated in the indoor of calf showed the greatest sensitivity. It was found that Bacillus coagulans ALM 86 showed more antagonistic properties compared to the antibiotic against S. agalactiae - by 18.93%; Candida - by 29.16%; S. aureus - by 15.56%. Bacillus pumilus LA 56 strain inhibited the colony's growth of S. epidermidis by 20.49%; E. coli 28.78%; Candida - by 7.33% more than cephalaxin. B. megaterium NCH 55 showed antimicrobial properties against S. aureus and E. fecalis identical to the antibiotic cephalaxin. As a result of the conducted research probiotics which can become an alternative of antibiotics are defined. The prospect of further research in this direction is to determine the mechanism of action of probiotics Bacillus megaterium NCH 55, Bacillus coagulans ALM 86 and Bacillus pumilus LA 56 on pathogenic microorganisms and determine the therapeutic effect on animals.*

**Key words:** calves, bacterial antagonism, antibiotic resistance, B. amyloliquefaciense, B. mucilaginosus, B. coagulans, B. megaterium, B. pumilus.