

ВИЗНАЧЕННЯ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ «БІОЗАПІН»

Чечет Ольга Миколаївна

кандидат ветеринарних наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0001-5099-5577

o.chechet@vetlabresearch.gov.ua

Коваленко Вячеслав Леонідович

доктор ветеринарних наук, професор

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0002-2416-5219

kovalenkodoktor@gmail.com

Горбатюк Ольга Іванівна

кандидат ветеринарних наук, доцент

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0002-0573-2089

Goroliva@ukr.net

Гайдей Ольга Сергіївна

кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0003-4503-4047

olga.gaidei@gmail.com

Кравцова Оксана Леонідівна

молодший науковий співробітник

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0003-2119-7749

oksana759@ukr.net

Андріящук Валентина Олександрівна

кандидат ветеринарних наук

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0002-0983-9297

and_valentina@hotmail.com

Мусієць Ірина Володимирівна

молодший науковий співробітник

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,,

м. Київ, Україна

ORCID: 0000-0002-2456-560X

bacdndi@ukr.net

Ординська Діана Олександрівна

молодший науковий співробітник

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи,

м. Київ, Україна

ORCID:0000-0003-3481-3248

ordynskadiana@ukr.net

За сучасного розвитку птахівництва пріоритетним є органічне ведення галузі. Тому питання забезпечення епізоотичного благополуччя птиці потребують ґлибокого вивчення і корекції в нових умовах господарювання. За даними вчених, особливо це стало актуальним після впровадження новітніх енергозберігаючих технологій та прийняття інноваційних рішень щодо утримання та годівлі птиці, пріоритетним із яких є корекція біоценозів шлунково-кишкового тракту птиці. Найбільш економічно вигідним є застосування препаратів на основі речовин природного походження, якими є новітні пробіотики, одержані на основі представників нормальної коменсальної мікрофлори. Тому, інтерес до пробіотиків, в т.ч. на основі *Bacillus subtilis*, пов'язаний із можливістю впливу на формування нормофлори шлунково-кишкового тракту птиці, підтриманні її сталого балансу та біобезпеки навколишнього середовища, в якому вона перебуває.

Розроблений нами новий пробіотик «Біозапін», складовими компонентами якого є бактерії *Bacillus subtilis* і *Bacillus amyloliquefaciens*, здатний забезпечувати означені вимоги. Метою роботи було дослідити антагоністичну активність нового пробіотику «Біозапін» за його взаємодії з грамнегативними та грампозитивними тестовими бактеріями «in vitro». Випробування пробіотику «Біозапін» проведено двома методами – методом відтермінованого антагонізму та методом блоків з триразовими повторюваностями дослідів. За виконання обох методів в якості індикаторів використані тестові мікроорганізми *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Облік результатів проведено за величиною діаметрів зон пригнічення росту тестових культур мікроорганізмів. Аналіз результатів випробувань пробіотику «Біозапін», за використання означених методів, показав ефективну антагоністичну активність препарату за його взаємодії з тестовими культурами грампозитивних і грамнегативних бактерій. Доведено методом відтермінованого антагонізму та методом блоків дуже високий та високий рівні антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін» щодо дії на тестові бактерії, зокрема на *Escherichia coli* ATCC 25922 з діаметрами зон інгібування росту $39,1 \pm 0,13$ і $35,8 \pm 0,13$ мм відповідно до методу; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 – $30,1 \pm 0,07$ і $31,5 \pm 0,87$; *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 – $37,3 \pm 0,27$ і $36,7 \pm 0,13$ і *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – $38,9 \pm 0,07$ і $37,7 \pm 0,13$ аналогічно. Перспективність застосування пробіотику «Біозапін» у сучасному птахівництві полягає у підтриманні біологічним способом стабільної епізоотичної ситуації щодо бактеріальних інфекцій серед птиці та правильному формуванню мікробіоценозу у шлунково-кишковому тракті птиці від народження, особливо за технологій підлогового утримання.

Ключові слова: пробіотик «Біозапін», антагоністична активність, пробіотичні культури, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, біологічне знезараження, поверхнево-активні речовини мікробного походження.

DOI <https://doi.org/10.32845/bsnau.vet.2022.2.8>

Вступ. Сучасний розвиток промислового птахівництва та пріоритети його переходу на органічне ведення галузі, потребують пошуків нових засобів і препаратів, які б пригнічували розвиток у птиці патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, оскільки найбільший їх вплив на формування і стан організму відбувається на початку життя через заселення шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Тому, підвищений інтерес до пробіотичних препаратів пов'язаний із їх альтернативою антибіотикам для протидії патогенам (Yakhia, Al-Bk. T., 2021; Kopopelko A. V., Liasota V. P., 2022; Stoianovskiy V. H. et al., 2013; Iehorov V. et al., 2022; Solodka L. O. et al., 2021; Potemaska O. I. et al., 2017; Romanovych M. M., 2018).

У технологічному процесі вирощування птиці велике значення має спосіб її утримання та щільність поголів'я. Забезпечення епізоотичного благополуччя птиці є одним із основних питань, яке потребує більш ґлибокого вивчення і корекції в нових умовах господарювання за розвитку органічного птахівництва. Крім забезпечення внутрішнього стабільного стану нормофлори ШКТ птиці, важливо дотримуватися безпеки навколишнього середовища, в якому вона перебуває, зокрема поверхонь стін і підлоги, годівниць, підстилки (Balasubramanian B. et al., 2016; Xiang-Li et al., 2020; Cash B. D., 2014; Hudzenko T. V. et al., 2019; Chiu, Y. H. et al., 2014).

За науковими даними відомо, що бактерії роду *Bacillus* spp., зокрема *Bacillus subtilis* володіють значним біологічним потенціалом (Donaldson G. P. et al., 2016; Petrov I. V. et al., 2022; Syal P, Vohra A., 2013).

Пробіотичний препарат «Біозапін» у своєму складі містить мікроорганізми *Bacillus subtilis* та *Bacillus amyloliquefaciens* на алюмосилікаті.

За останніми науковими даними відомо, що *Bacillus subtilis* є продуцентом не лише антибіотичних речовин, а й поверхнево-активних речовин (ПАР), зокрема ліпопептиду сурфактину, який доповнює та посилює антибактеріальну дію, забезпечує гемолізис і утворення іонних каналів у ліпідних мембранах; ліпопептиду № 1, який здійснює активний антибактеріальний вплив на спорові мікроорганізми; ліпопептид ітурин, який проявляє антибактеріальну дію та підвищує електропровідність ліпідів у мембранах. Продукцію таких речовин забезпечує бактеріям *Bacillus subtilis* проявляти активний антагонізм через перевагу щодо колонізації нових середовищ та конкуренції за субстрати з патогенними мікроорганізмами, зокрема і при заселенні ШКТ птиці (Klaenhammer T R et al., 2012; Medvid S. M. et al., 2017).

Мікроорганізми *Bacillus amyloliquefaciens*, крім антибіотичних, продукують ліпопептид баломіцин А, для якого характерна антифумігальна активність (Klaenhammer T R et al., 2012).

Поєднання означених пробіотичних культур у препараті «Біозапін» та використання пробіотику для біологічного знезараження об'єктів навколишнього середовища, зокрема підстилки для птиці, надає можливість підтримання антибактеріальної та антифумігальної безпечності зовні.

Метою роботи було дослідити антагоністичну активність пробіотичного препарату «Біозапін» за вза-

емодії з грамнегативними та грампозитивними тестовими бактеріями.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили на базі лабораторії діагностики захворювань бактеріальної етіології (ЛДЗБЕ) науково-дослідного мікробіологічного відділу (НДМВ) Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ).

Для проведення досліджень в якості індикаторних використовували грамнегативні тестові культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та грампозитивна тестова культура *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, одержані із Музею культур тестових мікроорганізмів ЛДЗБЕ.

Дослідження з визначення рівня антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін» проводили в умовах лабораторії, використовуючи два дифузійні методи: метод відтермінованого антагонізму та методом блоків.

Пробіотичний препарат «Біозапін» є сухим порошком із вмістом бактерій *Bacillus subtilis* і *Bacillus amyloliquefaciens* у кількості по $1,0 \times 10^9$ КУО/г. Для проведення випробувань 1 г препарату розводили у $9,0 \text{ см}^3$ стерильної дистильованої води та ретельно перемішували одержану суспензію пробіотику, при цьому вміст означених бактерій уже складав по $1,0 \times 10^8$ КУО/г. За умовами постановки досліду методом відтермінованого антагонізму для одержання окремих колоній пробіотичних культур, які входять до складу препарату, проводили підтитрування суспензії пробіотика за загальноприйнятною методикою послідовних розведень (Ashraf R., Shah N P., 2014). За результатами підтитрування було встановлено, що для отримання окремих колоній пробіотичних бактерій, які входять до складу пробіотика «Біозапін», необхідно застосовувати суспензію препарату у концентрації 10^2 КУО/см³.

Виконання випробувань з встановлення рівня антагоністичної активності пробіотику «Біозапін» методом відтермінованого антагонізму проводили на чашках Петрі з 2,0 % м'ясо-пептонним агаром (МПА) (Lutgendorff F et al., 2009). Суспензію пробіотичного препарату у підтитрованій концентрації висівали на чашки Петрі з МПА, інкубували за температури 37 ± 1 °C протягом 48 год. Після цього у чашки Петрі з вирослими окремими макроколоніями пробіотичних культур вносили хлороформ в об'ємі до 3 см^3 , щоб він охопив всю площину чашки, витримували протягом 5 хв, зливали залишки та підсушували поверхню МПА з макроколоніями в асептичних умовах протягом 30 хв.

Паралельно проводили посіви добових тестових культур мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та підрощували їх у термостаті за температури 37 ± 1 °C протягом 6 год. Одержані бульйонні тестові культури вносили в об'ємі по $0,1 \text{ см}^3$ в пробірки з $5,0 \text{ см}^3$ розплавленого і охолодженого до температури 45 ± 1 °C 0,7 % напіврідкого поживного агару

(НРА). Суміш швидко і ретельно перемішували та виливали на поверхню підсушених чашок Петрі з макроколоніями пробіотичних мікроорганізмів, ретельно розподіляючи її по поверхні МПА. Після повного застигання суміші НРА з відповідною тестовою культурою, чашки перенесли до термостату та інкубували посіви за температури 37 ± 1 °C протягом 24 год.

Дослідження пробіотичного препарату «Біозапін» з відповідними тестовими культурами бактерій були проведені у трьох повторюваностях.

Поряд з основним дослідом ставили контролі росту тестових культур бактерій аналогічно, але без посіву суспензії дослідного пробіотику.

Облік результатів проводили, визначаючи діаметр зон інгібування росту або констатуючи її відсутність у тестових бактерій навколо макроколоній мікроорганізмів роду *Bacillus*, які входять до складу пробіотичного препарату. Рівень антагоністичної активності пробіотику «Біозапін» вважали умовно низьким, якщо діаметр зони затримки росту коливався у межах від 7 до 14 мм; середній рівень – в межах 14–26 мм; високий рівень – в межах 27–36 мм та дуже високий рівень – більше 36 мм за інтенсивного росту індикаторних тестових бактерій у відповідних контролях.

Після обліку результатів з визначення рівня антагоністичної активності, одержані показники було оброблено статистично (Lutgendorff F et al., 2009).

Всі методи з визначення рівня антагоністичних властивостей у пробіотичних препаратів є неточними, тому для підтвердження попередніх результатів досліджень методом відтермінованого антагонізму нами було паралельно проведено випробування іншим методом – методом агарових блоків у нашій модифікації (Ivchenko V. M., (2004). Для одержання блоків розведену, як у попередньому досліді (1 г пробіотика+ $9,0 \text{ см}^3$ стерильної дистильованої води), суспензію пробіотику вносили в розплавлений та охолоджений до температури 45 ± 1 °C МПА у співвідношенні 1:10 (1 частина розведеної суспензії та 9 частин агаризованого середовища), ретельно перемішували та розливали в стерильні чашки Петрі по $15,0 \text{ см}^3$ у кожну. Чашки залишали до повного застигання середовища та проводили культивування у термостаті за температури 37 ± 1 °C протягом 24 год. Після культивування в асептичних умовах із засіяного агару за допомогою стерильного пробійника з діаметром 9 мм вирізали агарові блоки.

Для одержання добових тестових культур мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 їх паралельно висівали на МПА та культивували у термостаті за температури 37 ± 1 °C протягом 24 год. Після культивування в асептичних умовах проводили змив відповідних тестових бактерій стерильним фізіологічним розчином та виготовляли бактеріальну суспензію з концентрацією 0,5 ОО за оптичним стандартом каламутності Мак-Фарланда. Одержані бактеріальні суспензії висівали кожну окремо на чашки Петрі з МПА, ретельно розтирали по всій площині середовища для майбутнього отримання

якісного газону тестових бактерій. Чашки з посівами залишали за кімнатної температури протягом 15 хв для дифузії в агар відповідних тестових мікроорганізмів. Далі на поверхню засіяних чашок накладали по 3 вирізані блоки з пробіотиком, рівновіддалено один від одного та культивували за температури 37 ± 1 °C протягом 24 год.

Облік результатів проводили за величиною діаметрів зон пригнічення росту тестових культур мікроорганізмів: низький рівень, якщо діаметр зони затримки росту коливався у межах від 7 до 14 мм; середній рівень – в межах 14–26 мм; високий рівень – в межах 27–36 мм та дуже високий рівень – більше 36 мм за інтенсивного росту індикаторних тестових бактерій у відповідних контролях. Одержані результати були оброблені статистично (Ойун Y. A., 1960).

За закінчення основних дослідів, поставлених обома дифузійними методами, було проведено порівняльний аналіз одержаних результатів щодо антагоністичної активності препарату «Біозапін».

Методи досліджень: мікробіологічний, статистичний.

Результати досліджень. Аналіз результатів досліджень з визначення рівня антагоністичної активності методом відтермінованого антагонізму показав, що пробіотичний препарат «Біозапін», до складу якого входять мікроорганізми *Bacillus subtilis* і *Bacillus amyloliquefaciens*, володіє високими антибактеріальними властивостями стосовно тестових грампозитивних бактерій – *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та грамнегативних – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630.

За проведених випробувань пробіотичного препарату щодо наслідків його впливу на тестову культуру *Escherichia coli* ATCC 25922 було встановлено дуже високий рівень антагонізму, адже пробіотик спричиняв загибель тестових мікроорганізмів, утворюючи зону затримки росту за діаметром в середньому $39,1 \pm 0,13$ мм за інтенсивного росту тестової культури у контролі. Аналогічно дуже високий рівень антагоністичної активності був виявлений за дії пробіотичного препарату на тестові бактерії *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та *Salmonella typhimurium* ATCC 29630, що засвідчено величиною діаметру зони інгібування росту, яка становила $38,9 \pm 0,07$ та $37,3 \pm 0,27$ мм відповідно за інтенсивного росту тестових бактерій у контролях (табл. 1).

За дії пробіотичного препарату «Біозапін» на тестову культуру мікроорганізмів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 були одержані дещо нижчі за рівнем показники антагоністичної активності, проте діаметри зон затримки росту – $30,1 \pm 0,07$ мм, знаходилася в межах величин, які засвідчують високий рівень антимікробної дії препарату.

Таким чином, за одержаними результатами випробувань, проведеними методом відтермінованого антагонізму, пробіотичний препарат «Біозапін» показав дуже високу і ефективну антагоністичну активність щодо дії на грампозитивні і грамнегативні тестові культури мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 і *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 за величиною показників діаметрів зони інгібування росту та за інтенсивного росту тестових бактерій у відповідних контролях.

Таблиця 1

Результати досліджень рівня антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін» щодо дії на грампозитивні і грамнегативні тестові бактерії методом відтермінованого антагонізму, $M \pm m$, мм, $n=3$

Кількість досліджень	Назва пробіотичного препарату та номер проби	Культури тестових мікроорганізмів							
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29630		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
		Діаметр зони інгібування росту, мм	Рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності	Діаметр зони інгібування росту, мм	рівень антагоністичної активності
3	1. Пробіотик «Біозапін»	39,2	дуже високий	30,2	високий	37,0	дуже високий	38,8	дуже високий
	2. – «» –	39,2	дуже високий	30,0	високий	37,8	дуже високий	39,0	дуже високий
	3. – «» –	38,8	дуже високий	30,2	високий	37,2	дуже високий	39,0	дуже високий
Середні показники рівня антагоністичної активності		$39,1 \pm 0,13$	дуже високий	$30,1 \pm 0,07$	високий	$37,3 \pm 0,27$	дуже високий	$38,9 \pm 0,07$	дуже високий

Результати досліджень рівня антагоністичної активності пробіотику «Біозапін» щодо тестових культур мікроорганізмів методом агарових блочків; M±m, мм, n=3

Назва тестових культур мікроорганізмів	Агарові блоки з пробіотиком «Біозапін»:						Середні показники зон затримки росту, мм	Рівень антагоністичної активності
	№ 1		№ 2		№ 3			
	Діаметр зони інгібування росту, мм Diameter of the growth inhibition zone, mm	Рівень антагоністичної активності The level of antagonistic activity	Діаметр зони інгібування росту, мм Diameter of the growth inhibition zone, mm	Рівень антагоністичної активності The level of antagonistic activity	Діаметр зони інгібування росту, мм Diameter of the growth inhibition zone, mm	Рівень антагоністичної активності The level of antagonistic activity		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	36,0	високий	35,6	високий	35,8	високий	35,8 ± 0,13	високий
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	30,0	високий	32,0	високий	32,6	високий	31,5 ± 0,87	високий
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29630	37,0	дуже високий	36,6	дуже високий	36,6	дуже високий	36,7 ± 0,13	дуже високий
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	38,0	дуже високий	37,8	дуже високий	37,2	дуже високий	37,7 ± 0,13	дуже високий

Оскільки всі методи досліджень антагоністичної активності мікроорганізмів вважаються неточними, рекомендовано застосовувати, як мінімум, два методи для непрямого підтвердження одержаних результатів, нами застосовано метод блоків. Аналіз результатів досліджень, виконаних цим методом показав, що пробіотик «Біозапін» проявляв дуже високі антагоністичні властивості за взаємодії з *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, що було засвідчено величиною діаметрів зон затримки росту – 36,7±0,13 і 37,7±0,13 мм відповідно (табл. 2).

Нижчі за показники попереднього досліджу, але все ж на рівні високої антагоністичної властивості, нами були одержані результати випробувань пробіотичного препарату «Біозапін» за взаємодії з тестовою культурою *Escherichia coli* ATCC 25922 із її діаметром зони інгібування росту 35,8±0,13 мм, проте дані засвідчували високу ефективність пробіотику.

Таким чином, за результатами досліджень, проведеними методом блоків, пробіотик «Біозапін» показав дуже високу і високу та ефективну антагоністичну активність за взаємодії з грамнегативними і грампозитивними тестовими культурами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 і *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 за величиною показників діаметрів зони інгібування росту та інтенсивного росту тестових мікроорганізмів у відповідних контролях.

Обговорення. За сучасними науковими даними відомо, що високий рівень контамінації кормів та оточуючого середовища призводить до випереджаючої колонізації ШКТ птиці патогенними мікроорганізмами, що або уповільнює або перешкоджає формуванню нормо-

флори у кишечнику (Kryvtsova M. V., Nikolaichuk M. V., 2011; Kotsiumbas H. et al., 2017; Mehta R et al., 2011; Huyghebaert G, Ducatelle R., 2014).

Вчені наголошують, що альтернативою антибіотикам для стримування розвитку патогенів є пробіотичні препарати, які вдало поєднують у собі коректорів нормофлори ШКТ птиці та виконують інші функції [Kucheruk M. D. et al., 2018; Khariv M. et al., 2017; Klaenhammer T R et al., 2012).

Низка вчених, за результатами власних досліджень, доводять, що пробіотичні штами мікроорганізмів *Bacillus subtilis* зокрема, забезпечують корекцію мікрофлори птиці в сторону збільшення лакто- і біфідобактерій та зменшення кількості умовно-патогенних і патогенних бактерій (Cash B. D., 2014; Krysenko O. V. et al., 2010; Markowiak P, Śliżewska K., 2018; Palma M L et al., 2015; Yermolina K. O., 2012).

Одержані нами дані підтвердили дуже високий та високий рівні антагоністичної активності нового розробленого пробіотику «Біозапін» з пробіотичною культурою *Bacillus subtilis* у своєму складі за дії на тестові культури патогенів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 і *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 та вказують на перспективність його застосування в умовах птахогосподарств та за промислового вирощування птиці.

Висновки. Виявлено і доведено методом відтермінованого антагонізму та методом блоків дуже високий та високий рівень антагоністичної активності пробіотичного препарату «Біозапін» щодо дії на грамнегативні і грампозитивні тестові бактерії *Escherichia coli* ATCC 25922 (діаметри зон інгібування росту 339,1±0,13 і 35,8±0,13 мм відповідно), *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 15442 (30,1±0,07 і 31,5±0,87), *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 (37,3±0,27 і 36,7±0,13) і *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (38,9±0,07 і 37,7±0,13). Пробиотик «Біозапін» сприятиме підтриманню біологічним способом стабільної епізоотичної ситуації щодо

бактеріальних інфекцій серед птиці, правильному формуванню мікробіоценозу у ШКТ птиці від народження, особливо за технологій її підлогового утримання, що робить його перспективним для застосування у птахівничій галузі.

Бібліографічні посилання:

1. Al-Bkur Tarek Yakhia (2021). Vplyv preparativ «Sporo-Leks» та «Analhitsym-SI» na mikrofluoru shlunkovo-kyshkovoho traktu ptytsi. [The effect of «Sporo-Lex» and «Analgicim-SI» drugs on the microflora of the gastrointestinal tract of poultry]. *Naukovo-tehnichnyi biuleten DNDKIVPKD*; 2021, 22 (2), 25–32. doi: 10.36359/scivp.2021-22-2.02.
2. Ashraf R. & Shah, N P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 54 (7), 938–56. doi: 10.1080/10408398.2011.619671.
3. Balasubramanian, B., Li, T. & Kim, In Ho (2016). Effects of supplementing growing-finishing pig diets with *Bacillus spp.* probiotic on growth performance and meat-carcass grade quality traits. *R. Bras. Zootec*; 2016, 3 (45), 93–100.
4. Cash, B. D. (2014). Emerging Role of Probiotics and Antimicrobials in the Management of Irritable Bowel Syndrome. *Curr Med Res Opin*; 30 (7), 1405–1415. doi: 10.1185/03007995.2014.908278.
5. Chiu, Y. H., Lin, S. L., Tsai, J. J. & Lin, M. Y. (2014). Probiotic actions on diseases: implications for therapeutic treatments. *Food Funct*; 2014, 5 (4), 625–634.
6. Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*; 2016, 14 (1), 20–32.
7. Iehorov V., Kanyanykhina O. & Turpurova T. (2022). Probiotichni kormovi dobavky v rokakh silskohospodarskykh tvaryn. [Probiotic feed additives in the years of farm animals] *Zernovi produkty ta kombikormy*; 21 (4), 25–31. <https://doi.org/10.15673/gpmf.v21i4.2250>. (in Ukrainian).
8. Yermolina K. O. (2012). Zahalni vlastyvoli probiotychnykh preparativ. [General properties of probiotic preparations]. Tezy dopovidei IV Vseukrainskoi naukovo-praktychnoi konferentsii. (Kyiv, 5 kvitnia 2012 r). – *Natsionalnyi tekhnichnyi universytet «Kyivskiy politekhnichnyi instytut»*; 2012, 42–43. (in Ukrainian).
9. Huyghebaert G. & Ducatelle R. (2014). An up-date on alternatives to antimicrobial growth promoters for broiler-ers. *Vet. J.*; 2014, (187), 182–188. doi: 10.1016/j.tvj.2010.03.003.1.
10. Hudzenko T. V., Konup I. P., Voliuvach O. V., Horshkova O. H., Beliaieva T. O. & Chaban M. M. (2019). Vyluchennia fenolu z vody bakteriiamy *Bacillus subtilis* ONU551, adhezovanyymi na nosiakh riznoi pryrody. [Extraction of phenol from water by bacteria *Bacillus subtilis* ONU551, adhered to supports of different nature]. *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia*; 2019, 1, 36–47. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/23074663.2019.1\(45\).160071](http://dx.doi.org/10.18524/23074663.2019.1(45).160071). (in Ukrainian).
11. Ivchenko V. M. (2004). Dovidnyk sanitarno-mikrobiolohichnykh metodiv doslidzhennia kharchovykh produktiv ta ob'ektiv dovkillia. [Handbook of sanitary and microbiological methods of research of food products and environmental objects]. *Bila Tserkva, 2004*; 242 s. (in Ukrainian).
12. Klaenhammer, T R, Kleerebezem M, Kopp M V. & Rescigno M. (2012). The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*; 2012, 12, 728–734. doi: 10.1038/nri3312.
13. Konopelko A. V. & Liasota V. P. (2022). Zabiini umovy, bezpeka ta yakist produktiv zaboiu indychok miasnoi produktivnosti pry zastosuvanni prebiotynnoho preparatu Aktyhen. [Slaughter conditions, safety and quality of slaughter products of meat-yielding turkeys with the use of the prebiotic drug Aktygen]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Hzhyskoho*; 24 (106), 119–127. <https://doi.org/10.32718/nlvvet10619>. (in Ukrainian).
14. Kryvtsova M. V. & Nikolaichuk M. V. (2011). Ekolohiia mikroorganizmiv. [Ecology of microorganisms]. Navchalnyi posibnyk. Uzhhorod: 2011; 184 s. (in Ukrainian).
15. Kucheruk M. D., Zasiakin D. A. & Dymko R. O. (2018). Mikrobiolohichne ta sanitarno-higienichne znachennia eubiozu kyshechnykh produktivnykh tvaryn. [Microbiological and sanitary-hygienic significance of intestinal eubiosis of productive animals]. *Ukrainskyi ekolohichnyi zhurnal*; 2018, 8 (2), 287–293. doi: 10.15421/2018_340. (in Ukrainian).
16. Khariv M., Hutyi B., Ohorodnyk N., Vishchur O., Khariv I., Solovodzinska I., Mudrak D., Hrymak Ch. & Bodnar P. (2017). Diialnist T- ta V-systemy klitynnoho imunitetu tvaryn v umovakh oksydnogo stresu ta dii liposomalnoho preparatu. [Activity of the T- and B-systems of cellular immunity of animals under conditions of oxidative stress and the action of the liposomal drug]. *Ukrainskyi ekolohichnyi zhurnal*; 2017, 7 (4), 536–541. doi: 10.15421/2017_157. (in Ukrainian).
17. Krysenko O. V., Skliar T. V., Vinnikov A. I., Slipetska A. V. & Kudenko S. S. (2010). Mikrobiolohichni aspekty probiotychnykh preparativ. [Microbiological aspects of probiotic preparations]. *Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Biolohiia. Ekolohiia*; 2010, 18(2), 19–24. Rezhym dostupu: https://www.dnu.dp.ua/docs/visnik/fbem/program_5e54270f63d26.pdf. (in Ukrainian).
18. Klaenhammer T R, Kleerebezem M, Kopp M V. & Rescigno M. (2012). The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2012, 12, 728–734. doi: 10.1038/nri3312.
19. Kotsiumbas H., Kostyniuk A., Mysiv O. & Fedyk Yu. (2017). Histolohichna, histokhimichna kharakterystyka dvanadtsiatypaloi kyshky kurei-broileriv dlia zghodovuvannia kombikormu z vysokym vmistom probiotychnykh dobavok. [Histological, histochemical characteristics of the duodenum of broiler chickens for feeding compound feed with a high content of probiotic additives]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT imeni S.Z. Hzhyskoho*; 19 (77), 71–75. doi:10.15421/nlvvet7717. (in Ukrainian).
20. Lutgendorff F, Nijmeijer, R M, Sandström, P A, Trulsson, L M, Magnusson, K E, Timmerman, H M, van Minnen, L P, Rijkers, G T, Gooszen, H G. & Akkermans, L M. (2009). Probiotics prevent intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis in rats via induction of ileal mucosal glutathione biosynthesis. *PLoS ONE*; 2009, 4, 4512. doi: 10.1371/journal.pone.0004512.

21. Medvid S. M., Hunchak A. V., Stefanishyn O. M. & Pashchenko A. H. (2017). Stan mikrobiotsenozu kurchat-broileriv za dii tsytrativ mikroelementiv. [The state of microbiocenosis of broiler chickens under the action of trace element citrates]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT im. S. Z. Hzhyskoho*; 2017, 19 (74), 224–228. (in Ukrainian).
22. Markowiak P. & Śliżewska K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut. Pathog.*; 2018, 10 (21), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.
23. Mehta R, Dedina L. & O'Brien P J. (2011). Rescuing hepatocytes from iron-catalyzed oxidative stress using vitamins B1 and B6. *Toxicol. In Vitro*. 2011, 25, 1114–1122. doi: 10.1016/j.tiv.2011.03.015.
24. Oivyn Y. A. (1960). Statystycheskaia obrabotka rezultatov eksperymentalnykh yssledovanyi. [Statistical processing of the results of experimental studies]. *Patolohycheskaia fizyolohyia y eksperymentalnaia terapiia*. 1960; 396–401. (in Ukrainian).
25. Potemska O. I., Kihel N. F., Danylenko S. H. & Kopylova K. V. (2017). β- halaktozydazna aktyvnist yak kryterii vidboru shtamiv do skladu bakterialnykh preparativ. [β-galactosidase activity as a criterion for selection of strains for the composition of bacterial preparations]. *Kharchova nauka i tekhnolohiia*; 2017, 11 (3), 35–41. doi: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v11i3.604>. (in Ukrainian).
26. Petrov I. V., Vysekantsev I. P., Cherkashyna Ya. O. & Nardid E. O. (2022). Antahonistychna aktyvnist immobilizovanykh probiotykyv pislia zberihannia za nyzkykh temperatur. [Antagonistic activity of immobilized probiotics after storage at low temperatures]. *Aktualni problemy suchasnoi medytsyny*; 2022, 22, 1 (77), 111–116. doi:10.31718/2077-1096.22.1.111. (in Ukrainian).
27. Palma, M L, Zamith-Miranda, D, Martins, F S, Bozza, F A, Nimrichter, L, Montero-Lomeli, M, Marques, E T Jr. & Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015, 99 (16), 6563–6570. doi: 10.1007/s00253-015-6776-x. Epub 2015 Jul 4).
28. Romanovych M. M. (2018). Dynamika humoralnykh faktoriv zakhystu kurchat-broileriv za umov zastosuvannia pro biotychnykh preparativ. [Dynamics of humoral factors in the infection of chicken broilers for the minds of stosuvannya about biotic preparations]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT im. S. Z. Hzhyskoho*; 2018, 20 (83), 264–267. doi: 10.15421/nvlvet8352 <http://nvlvet.com.ua/>. (in Ukrainian).
29. Stoianovskiy, V. H., Kolomiets I. A., Kolotnytskyi V. A. & Kamratska O. I. (2013). Mikroekolohichna systema kyshechnyku broileriv ta sposoby yii bionormalizatsii. [Microecological system of intestines of broilers and methods of its bionormalization]. *Naukovyi visnyk LNUVMBT im. S. Z. Hzhyskoho*; 2013, 15, 3 (57), 319–322. (in Ukrainian).
30. Solodka L. O., Rybachuk Zh. V. & Klishevych V. I. (2021). Identyfikatsiia mikroorhanizmiv pevnykh vydiv u batsyliarnykh probiotychnykh preparatakh. [Identification of microorganisms of certain species in bacillary probiotic preparations]. *Zbirnyk tez mizhn. nauk.-prakt. konf. «Biobezpeka, zakhyst ta blahopoluchchia tvaryn»* (21 travnia 2021 r.); Kyiv, 2021; 27–31. (in Ukrainian).
31. Syal P. & Vohra A. (2013). Probiotic potential of yeasts isolated from traditional indian fermented foods. *Intl J Microbiol Res.*; 2013, 5 (2), 390–398. doi: 10.9735/0975-5276.5.2.
32. Xiang-Li, Si-Chen, Z.-T. Zhao, Meng-Zhao, Yi-Han & Xi-Mei Ye (2020). Effects of polysaccharides from Yingshan Yunwu tea on meat quality, immune status and intestinal microflora in chickens. *International Journal of Biological Macromole*; 2020, 15, 155, 61–70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.198>.

Chechet O. M., Candidate of Veterinary Sciences, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Kovalenko V. S., Doctor of Veterinary Sciences, Professor, State Research and Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv, Ukraine

Gorbatyuk O. I., Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Gaidei O. S., Candidate of Veterinary Sciences, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Kravtsova O. L., Junior Researcher, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Andriyashchuk V. O., Candidate of Veterinary Sciences, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Musiets I. V., Junior Researcher, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Ordynska D. O., Junior Researcher, State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

Determination antagonistic activity of the probiotic drug “Biozapin”

According to the modern development of poultry farming, organic management of the industry is a priority. Therefore, the issue of ensuring the epizootic well-being of poultry requires in-depth study and correction in new farming conditions. According to scientists, this became especially relevant after the introduction of the latest energy-saving technologies and the adoption of innovative decisions regarding the maintenance and feeding of poultry, the most priority of which is the correction of biocenoses of the gastrointestinal tract (GI) of poultry. The most economically beneficial is the use of preparations based on substances of natural origin, which are the latest probiotics, obtained on the basis of representatives of normal commensal microflora.

Interest in probiotics, incl. on the basis of *Bacillus subtilis*, associated with the possibility of influencing the formation of the normal flora of the gastrointestinal tract of the bird, maintaining its stable balance and biosafety of the environment in which it is located.

Therefore, interest in probiotics, including on the basis of *Bacillus subtilis*, associated with the possibility of influencing the formation of the normal flora of the gastrointestinal tract of the bird, maintaining its stable balance and the biosafety of the environment in which it is located.

The new probiotic «Biozapin» developed by us, the components of which are the bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, is able to meet the specified requirements. The aim of the work was to investigate the antagonistic activity of the new probiotic «Biozapin» in its interaction with gram-negative and gram-positive test bacteria «in vitro». Testing of the probiotic «Biozapin» was carried out by the method of delayed antagonism and the method of blocks with three times repetition of experiments. When performing both methods, the test microorganisms *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 29630, and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 were used as indicators.

The analysis of the results of tests of the probiotic «Biozapin», using the specified methods, showed the effective antagonistic activity of the drug in its interaction with test cultures of gram-positive and gram-negative bacteria. The method of delayed antagonism and the method of blocks proved very high and high levels of antagonistic activity of the probiotic drug «Biozapin» in relation to the action on test bacteria, in particular on *Escherichia coli* ATSS 25922 with the diameters of the growth inhibition zones of 39.1 ± 0.13 and 35.8 ± 0.13 mm, respectively to the method; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 – 30.1 ± 0.07 and 31.5 ± 0.87 ; *Salmonella typhimurium* ATCC 29630 – 37.3 ± 0.27 and 36.7 ± 0.13 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – 38.9 ± 0.07 and 37.7 ± 0.13 mm similarly. The perspective of using the probiotic «Biozapin» in modern poultry farming is to support a stable epizootic situation with regard to bacterial infections among birds and the correct formation of the microbiocenosis in the gastrointestinal tract of birds from birth, especially with floor-keeping technologies.

Key words: probiotic «Biozapin», antagonistic activity, probiotic cultures, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, biological disinfection, surfactants of microbial origin.