

УДК 573.6.086.83:577.18

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ ДЛЯ БОРЬБЫ С ИНФЕКЦИОННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ И ПТИЦЫ

*Кусин Р.А., *Раубо В.М., **Якимович Н.Н., **Якимович И.В., **Шункевич А.А., ***Черняк И.Н.

*УО «Белорусский государственный аграрно-технический университет», г. Минск, Республика Беларусь

**ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

***ГНУ «Институт порошковой металлургии», г. Минск, Республика Беларусь

*В статье приведены результаты исследования процесса получения бактериоцинов, предназначенных для борьбы с инфекционными заболеваниями сельскохозяйственных животных и птицы. Отобраны два наиболее активных продуцента, определены оптимальные режимы их культивирования (температура проведения биосинтеза, pH среды, концентрация кислорода), подобран состав питательной среды, разработана схема выделения бактериоцинов из культуральной жидкости, позволяющая увеличить антимикробную способность препарата по сравнению с культуральной жидкостью в 6 и более раз. **Ключевые слова:** инфекционные заболевания сельскохозяйственных животных и птицы, патогенные бактерии, биосинтез бактериоцинов, молочнокислые бактерии и дрожжи.*

A STUDY OF THE PROCESS OF OBTAINING BACTERIOCINS FOR THE CONTROL OF INFECTIOUS DISEASES OF FARM ANIMALS AND POULTRY

*Kusin R.A., *Raubo V.M., **Yakimovich N.N., **Yakimovich I.V., **Shunkevich A.A., ***Chernyak I.N.

*Belarusian State Agrarian Technical University, Minsk, Republic of Belarus

**Institute of Physical-Organic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Republic Of Belarus

***Powder Metallurgy Institute, Minsk, Republic of Belarus

*The article presents the results of a study of the process of obtaining bacteriocins, designed to combat infectious diseases of farm animals and poultry. The two most active producers are selected, the optimal modes of their cultivation are determined (the temperature of the biosynthesis, the pH of the medium, the oxygen concentration), the nutrient medium composition is chosen, the bacteriocin release from the culture liquid is developed, which allows to increase the antimicrobial ability of the preparation in comparison with the culture liquid of 6 or more time. **Keywords:** infectious diseases of farm animals and birds, pathogenic bacteria, biosynthesis of bacteriocins, lactic acid bacteria and yeast.*

Введение. В настоящее время наиболее сильным средством в борьбе с патогенными бактериями являются антибиотики. Однако их частое использование привело к появлению устойчивых к ним микроорганизмов и увеличению, в частности, аллергических заболеваний у населения [1]. Возрастающая проблема распространения патогенных бактерий, устойчивых к антибиотикам, вызвала повышенный интерес к применению альтернативных естественных микробных препаратов, в том числе антимикробных протеинов. Бактериоцины, продуцируемые пробиотическими штаммами молочнокислых бактерий, представляют перспективную альтернативу антибиотикам. Они отличаются от большинства терапевтических антибиотиков тем, что являются белковыми веществами, которые быстро перевариваются под действием протеаз в пищевом тракте [2-4]. Многие антибиотики способствуют развитию невосприимчивых штаммов, тогда как развитие устойчивости к бактериоцинам наблюдается очень редко [5, 6]. Как отмечено в работе [1], применение бактериоцинов оказывается более эффективным по сравнению с антибиотиками и для целей профилактики инфекционных заболеваний молодняка бройлеров, и для целей повышения зоотехнической эффективности их выращивания.

Целью настоящей работы является исследование процесса получения бактериоцинов для борьбы с инфекционными заболеваниями сельскохозяйственных животных и домашней птицы.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести селекционные работы и отобрать наиболее активные клоны молочнокислых бактерий и дрожжей для проведения исследовательских работ;
- изучить влияние температуры на рост и продукцию бактериоцинов бактериальными и дрожжевыми штаммами-продуцентами;
- изучить влияние активной кислотности на рост и продукцию бактериоцинов бактериальными и дрожжевыми штаммами-продуцентами;
- изучить влияние концентрации растворенного кислорода воздуха на рост и продукцию бактериоцинов бактериальными и дрожжевыми штаммами-продуцентами;
- оптимизировать состав питательных сред;
- разработать способ выделения бактериоцинов из культуральной жидкости после выращивания молочнокислых бактерий и дрожжей.

Материалы и методы исследований. Для выполнения поставленных задач были проведены селекционные работы, скрининг девяти штаммов микроорганизмов по способности образования биомассы и бактериоцинов. В результате были отобраны клоны молочнокислых бактерий *Lactobacillus rhamnosus* 109 и дрожжей *Kluyveromyces lactis* sp86. Указанные микроорганизмы использовали в дальнейшей работе. Исследования проводили на лабораторном биореакторе EDF-5.2 производства фирмы A/S «Biotechniskais Centrs» (рисунок 1).



Рисунок 1 – Ферментационная установка EDF 5.2

Результаты исследований. Результаты экспериментальных данных по изучению влияния на рост исследуемых микроорганизмов важных физико-химических параметров процесса биосинтеза представлены на рисунках 2-5 и в таблице 1 (С – концентрация биомассы, г/дм³; Т – температура культивирования).

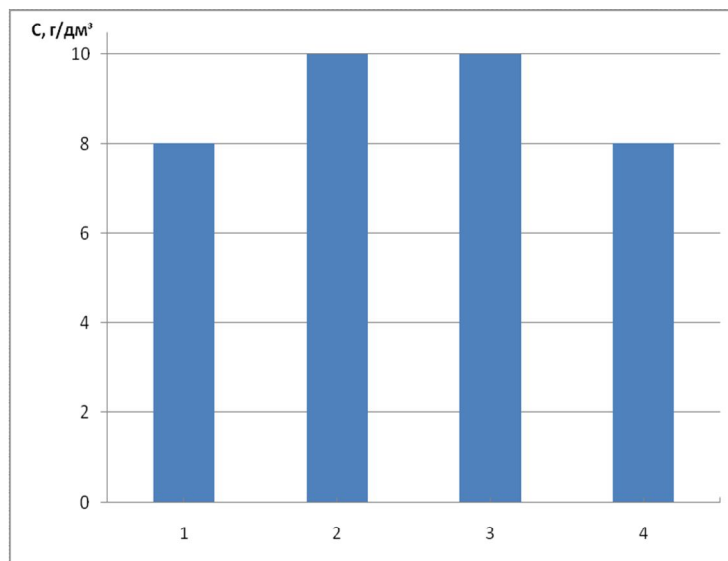


Рисунок 2 – Влияние температуры культивирования на накопление биомассы дрожжей *Kluyveromyces lactis* sp86 (Т: 1 – 20-22 °C; 2 – 26-28 °C; 3 – 30-32 °C; 4 – 34-36 °C)

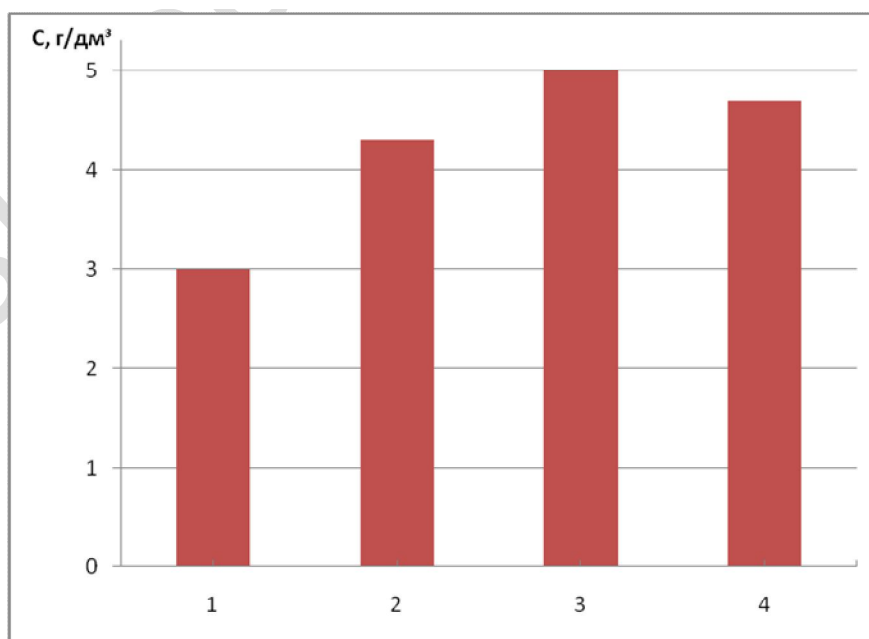


Рисунок 3 – Влияние температуры культивирования на накопление биомассы бактерий *L. rhamnosus* 109 (Т: 1 – 20-22 °C; 2 – 26-28 °C; 3 – 30-32 °C; 4 – 34-36 °C)

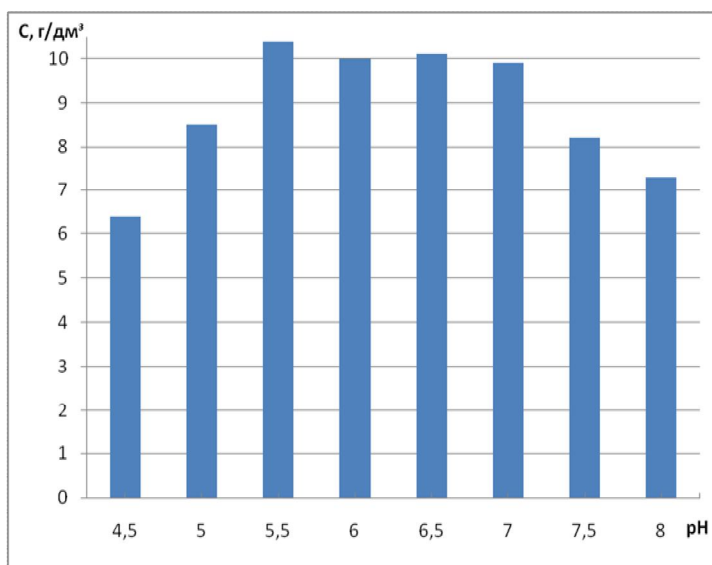


Рисунок 4 – Накопление биомассы молочнокислых дрожжей *Kluyveromyces lactis* sp86 при различных значениях pH среды

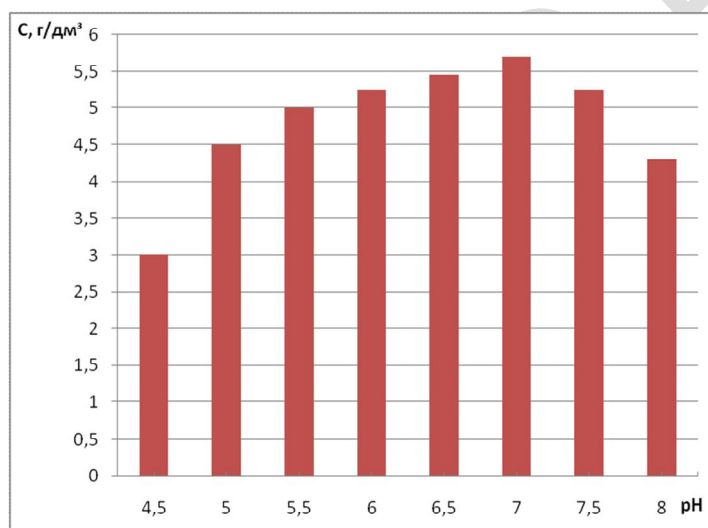


Рисунок 5 – Накопление биомассы молочнокислых бактерий *L. rhamnosus* 109 при различных значениях pH среды

Таблица 1 – Влияние интенсивности аэрации на величину антимикробной активности исследуемых продуцентов (тест-культура *B. subtilis*)

Наименование штаммов							
<i>L. rhamnosus</i> 109				<i>Kluyveromyces lactis</i> sp.86			
Содержание кислорода, %	Содержание биомассы, г/дм³	Время биосинтеза, час	DA (мл·мм ⁻¹)	Содержание кислорода, %	Содержание биомассы, г/дм³	Время биосинтеза, час	DA (мл·мм ⁻¹)
0	3,9	52,0	800,0	0	4,2	48,0	200,0
5,0	5,6	48,0	850,0	5,0	7,7	40,0	250,0
10,0	5,8	36,0	800,0	10,0	9,1	36,0	250,0
20,0	6,5	25,0	800,0	20,0	10,5	34,0	250,0
25,0	6,7	24,0	800,0	25,0	10,6	32,0	250,0

Экспериментальные данные, представленные на рисунках 2 и 3, свидетельствуют о том, что максимальное накопление биомассы молочнокислых дрожжей происходит в интервале температур от 28 до 32°C. Наибольшее накопление биомассы молочнокислых бактерий наблюдали в диапазоне температур 30–32°C. При более высоких температурах выход биомассы исследуемых продуцентов несколько уменьшается.

Как видно из данных, представленных на рисунках 4 и 5, наиболее высокая продуктивность молочнокислых дрожжей наблюдается в пределах pH от 5,5 до 7,0 ед. с максимумом при pH 5,5–6,5. Максимальное накопление биомассы молочнокислых бактерий происходит в интервале 6,5–7,0 ед. pH.

В таблице 1 представлены результаты исследований влияния интенсивности аэрации ферментационной среды атмосферным воздухом на процесс культивирования исследуемых микроорганизмов и биосинтеза бактериоцинов.

Анализ экспериментальных данных, представленных в таблице 1, показывает, что интенсивность аэрации существенно влияет на время проведения процесса биосинтеза бактериоцинов, но не оказывает существенного влияния на уровень их активности в ферментационной среде. В связи с этим можно рекомендовать после набора необходимого количества биомассы продуцентов аэрацию не проводить, а процесс накопления бактериоцинов продолжать без аэрации.

В связи с тем, что в наших исследованиях использовали молочнокислые микроорганизмы, в процессе конструирования состава питательной среды для их развития в качестве основного компонента применили молочную сыворотку – отход производства творога. С целью оптимизации состава питательной среды по содержанию минеральных солей была проведена серия экспериментов, в которых концентрацию источника азота и серы изменяли в пределах 0,1-0,4%, а источника калия и фосфора в пределах – 0,05-0,15%. В результате рациональная концентрация минеральных солей в составе питательной среды была определена в пределах: сульфат аммония – 0,3-0,4%, калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,10-0,15%. В этих диапазонах концентраций минеральных солей наблюдали наибольшее накопление биомассы популяций, а также более широкие зоны лизиса тест-культуры.

Важным этапом получения бактериоцинов является подготовка продукта для непосредственного использования сельскохозяйственными предприятиями. С этой целью была разработана схема выделения бактериоцинов из культуральной жидкости. В основу разработанной схемы, представленной на рисунке 6, были положены работы [7-9].

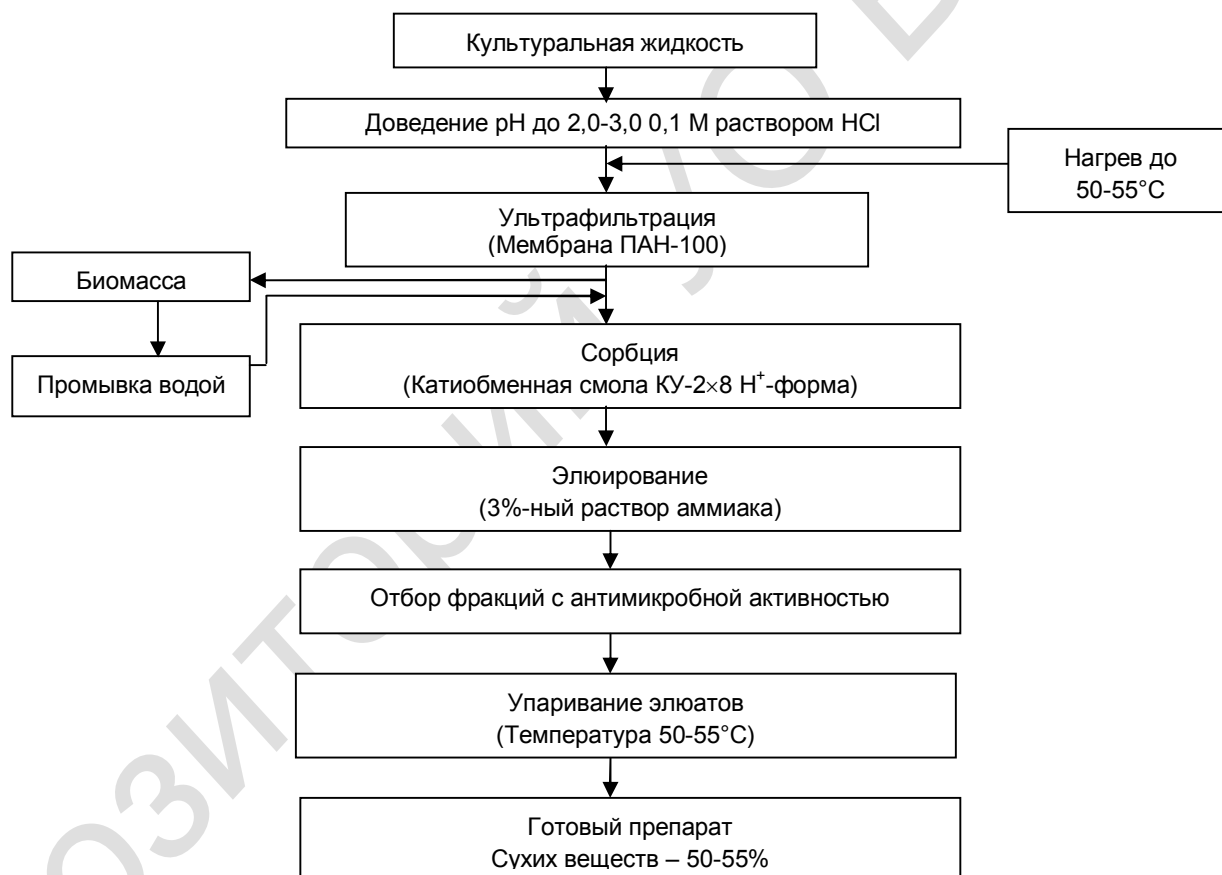


Рисунок 6 – Схема выделения бактериоцинов из культуральной жидкости

Первая стадия включает в себя ультрафильтрацию биомассы с использованием ультрафильтрационных мембран «МИФИЛ» ПАН-20, ПАН-100, ПА-20, ПА-100 и ПС-100 в зависимости от pH, количества промывок биомассы и степени концентрирования биомассы. На этой стадии pH культуральной жидкости, имеющей активную кислотность 3,8-4,2 ед. после ферментации, с биомассой доводили до pH = 2,0-3,0 с помощью 0,1 М раствора соляной кислоты. Подкисленную до указанных значений pH культуральную жидкость нагревали до температуры 65-70°C и выдерживали при данной температуре в течение 30 минут для инактивации протеаз. Биомассу отделяли ультрафильтрацией с использованием мембраны ПАН-100 и трехкратной промывки биомассы водой.

На второй стадии полученный супернатант культуральной жидкости без биомассы пропускали через колонку, заполненную катионитовой смолой КУ-2x8 (Россия) в H⁺-форме (аналог амберлий ИК-120 (США)), с объемом катионита в 600-1000 мл.

На третьей стадии осуществляли элюирование антимикробного бактерицидного веществ-

ва с колонки 2,5-3,0%-ным раствором аммиака при заданной скорости потока 0,5–0,6 см/мин. Во всех фракциях в дальнейшем определяли антимикробную активность на тест-культурах. Затем фракции, имеющие антимикробные свойства, объединяли и выпаривали на ротационном испарителе в вакууме при температуре 50-55°C (остаточное давление 0,1 МПа) до содержания сухих веществ приблизительно 50-55%. После очистки полученные частично очищенные антимикробные препараты (АМП) имели pH = 4,5-6,0.

В результате выделения бактериоцинов из культуральной жидкости по указанной схеме их концентрация в готовом продукте достигла 4800–5200 мл·мм⁻¹ ДА, т.е. более чем в шесть раз выше, чем в культуральной жидкости.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны штаммы молочнокислых бактерий и дрожжей, способных осуществлять повышенный биосинтез бактериоцинов. Установлено, что оптимальная температура культивирования молочнокислых дрожжей находится в интервале 28–30°C, а для выращивания молочнокислых бактерий – 30–32°C. Установлено, что самая высокая продуктивность молочнокислых дрожжей находится в диапазоне 5,5–6,5 ед. pH, а бактерий – в пределах 6,5–7,0 ед. pH.

Установлено, что для экономически целесообразного накопления бактериоцинов исследуемыми микроорганизмами необходимо на первой стадии биосинтеза обеспечить концентрацию кислорода в ферментационной среде в пределах 10–20% от максимального насыщения, после чего аэрацию можно прекратить и вести процесс в анаэробных условиях.

Подобрана питательная среда на основе творожной молочной сыворотки для выращивания молочнокислых бактерий и дрожжей с целью биосинтеза бактериоцинов. Питательная среда имеет следующий состав: сульфат аммония – 0,3-0,4%, калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,10-0,15%.

Разработана схема выделения бактериоцинов из культуральной жидкости, позволяющая увеличить антимикробную способность препарата по сравнению с культуральной жидкостью в 6 и более раз.

Литература. 1. Поломошнова, И. А. Использование пробиотиков для обеспечения бактериологической безопасности при выращивании цыплят-бройлеров / И. А. Поломошнова // «Вестник Донского государственного аграрного университета». - 2013. - №4(10). - С. 15-21. 2. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования. // М. : Наука, 1975. - С. 395. 3. Axelsson, L. Lactic acid bacteria : classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria. // Microbiology and functional aspects. - 2nd Edition. - Revised and Expanded: Edited by S. Salminen & A. von Wright. - 1998. - P. 51-72. 4. E. Parente, M. Giglio, A. Ricciardi, F. Clementi The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth // Int. J. Food Microbiol. - 1998. - Vol. 68. - P. 141-148. 5. M. Ferchichi, J. Frere, K. Mabrouk, M. Manai. Lactococin MMF II. A novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMF II, isolated from a Tunisian dairy product // FEMS Microbiol Lett. - 2001. - Vol. 205. - P. 49-55. 6. F. J. Carr, D. Chill & N. Maida. The lactic acid bacteria: a literature survey // Critical Reviews in Microbiology. - 2002. - Vol. 28. - P. 281-370. 7. Куваева, З. И., Лопатик, Д. В., Николаева, Т. А., Книжникова, А. Н., Найденов, В. Э., Маркович, М. М. / Получение и применение N-ацетил-α-аминокислот // Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44. № 6. С. 22-23. 8. Солдатов, В. С., Куваева, З. И. Экстракционная технология выделения аминокислот из сред микробиологического синтеза с помощью жидкого ионита // Химия в интересах устойчивого развития. 2001. № 9. С. 773-780. 9. Куваева, З. И. Ионнообменно-экстракционное выделение аминокислот. Вестн. Нац. Акад. наук Беларуси. Сер. хим наук, 1997, №2, с.6-12.

Статья передана в печать 07.09.2017 г.

УДК 619:616.62-002:615.33:636.4.055

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СВИНОМАТОК ПРИ УРОЦИСТИТЕ

*Петровский С.В., *Рубаник И.В., **Окулич В.К.

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

**УО «Витебский ордена «Дружбы народов» государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Нами было проведено изучение чувствительности бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*), выделенной из мочевых пузырей свиноматок, к ряду антимикробных препаратов. Высокая чувствительность была установлена к представителю фторхинолонов левофлоксацину. Для лечения свиноматок, больных уроциститом, был применен комбинированный препарат «Левовирин», содержащий левофлоксацин. Его применение позволило снизить продолжительность переболевания свиноматок, нормализовать содержание в крови эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина, а также физические и химические свойства мочи. **Ключевые слова:** уроцистит, свиноматки, кишечная палочка, антимикробная терапия, резистентность микроорганизмов.

COMPARATIVE EFFICIENCY OF APPLICATION OF ANTIBACTERIAL DRUGS FOR TREATMENT OF SOWS IN UROCISTITIS

*Piatrouski S. V., *Rubanik I. V., **Okulich V.K.

*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

**Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

We conducted a study of the sensitivity of *E. coli*, isolated from bladder sows, to a several antimicrobial drugs. High sensitivity was established to fluoroquinolone levofloxacin. For the treatment of sows, patients with urocystitis, a combina-