

2. Кириевский, И.Р. Болезни пчел / И.Р. Кириевский // М.: САТ; Донецк: Сталкер, 2006. – 303 с. 3. Кокорев, Н. Болезни и вредители пчел / Н. Кокорев, Б. Чернов // М.: ТИД Континент-Пресс, Континенталь-Книга, 2006. – 352 с. 4. Краткий определитель бактерий Берги / под ред. Дж. Хоупта, пер. с англ. С. Ш. Тер-Казарьяна, под ред. Г.А. Заварзина // М.: «МИР», 1980. – 496 с. 5. Писковой, Ф.Г. Эпизоотология американского и европейского гнильцов пчел и меры борьбы с ними в Краснодарском крае: автореф. дисс. ... канд. вет. наук / Ф.Г. Писковой. – Краснодар, 1954. 6. Солонко, А.А. Микробиология и иммунология: учеб. пособие. Ч. 1. Общая микробиология и иммунология / А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко и др.; под общ. ред. А.А. Гласкович, П.А. Красочко // Мн.: НПО «ИОН», 2002. – 248 с. 7. Солонко, А.А. Практикум по микробиологии / А.А. Солонко, А.А. Гласкович, Ф.Е. Тимофеев // Мн.: Дизайн ПРО, 1998. – 192 с. 8. Тимофеев, Ф.Е. Болезни пчел / Ф.Е. Тимофеев // Мн.: «Ураджай», 2000. – 182 с. 9. Херольд, Э. Новый курс пчеловодства / Э. Херольд, К. Вайс; пер. с нем. М. Беляева // 10-е изд., перераб. – М.: САТ: Астрель, 2008. – 368 с. 10. Albo, G.N. et al Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honeybees. *Apidologie*, 2003. – 34 (5). P. 417–428. 11. Hornitzky, M.A.Z. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly, *J. Apic. Res.*, 1998. – 37. – P. 267–271. 12. Kanbar, G. Do *Varroa destructor* mites transfer European foulbrood (*Melissococcus pluton*)? / Kanbar G; Engels W.; Winkelmann G. // *Apidologie*, 2002. – Vol. 33. – P. 487–88.

УДК 619.615.37

## ОЦЕНКА АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ПРОБИОТИКОВ

Жук В.П., Машеро В.А.

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

*Часть изучаемых штаммов обладает устойчивой антагонистической активностью в отношении тест-культур условно-патогенных микроорганизмов. Использование бесклеточных пробиотиков «Лактимет» и «Бацинил» в условиях производства способствует повышению резистентности организма за счет повышения или снижения (в зависимости от состояния организма) общего белка, незначительного повышения бактерицидной активности сыворотки крови, а фагоцитарной активности лейкоцитов — на 7,3%.*

*The part of studied stamms possesses steady opposing activity concerning test cultures of conditional-pathogenic microorganisms. Use acellular probiotics «Lactimet» and «Baciniл» in the conditions of effecting promotes increase of a resistance of an organism at the expense of increase or decrease (depending on an organism state) crude protein, slight increase of bactericidal activity of serum, and phagocytal activity of leucocytes on 7,3 %.*

**Введение.** Нарушение микробиоценоза кишечника часто является одной из причин возникновения массовых заболеваний и отхода животных. Поэтому решение проблемы по созданию новых биопрепаратов для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний актуально и имеет большой научный и практический интерес. На сегодняшний день, для нормализации микробиоценоза кишечника все большее распространение получает использование различных видов пробиотиков. Однако из-за особенностей пищеварения сельскохозяйственных животных возникает необходимость применения бесклеточных пробиотиков, т.е. препаратов, которые представляют собой продукты метаболизма лакто- и бифидобактерий, и в которых отсутствуют бактериальные клетки, что позволяет снять последствия переваривания бактериальных клеток. Это связано с тем, что особенностью пищеварения сельскохозяйственных животных является высокая переваримость белков животного, растительного и микробного происхождения под воздействием ферментов желудочного сока, что приводит к перевариванию корпускулярных пробиотиков на основе лакто- и бифидобактерий. Но продукты их метаболизма, цитоплазма бактериальных клеток проникает в кишечник и способствует угнетению условно-патогенной и патогенной микрофлоры, а также нормализации микробиоценоза кишечника. В этой связи применение бесклеточных пробиотиков, то есть препаратов, которые представляют собой продукты метаболизма бактерий и в которых отсутствуют бактериальные клетки, позволяет снять последствия переваривания бактериальных клеток. Особенностью бесклеточных пробиотиков также является высокая биологическая активность, и повышение срока их хранения до 1 года, тогда как жидкие клеточные препараты хранятся до 2-3 месяцев[1].

**Материал и методы.** Исследования проводились в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», ЗАО «Липовцы» Витебской области.

Для оценки антагонистической активности бактерий использованы штаммы лакто- и бифидобактерий, бацилл из коллекции микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», а также штаммы возбудителей желудочно-кишечных инфекций телят и поросят из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Предметом настоящего исследования была антагонистическая активность штаммов – продуцентов метаболитов, а также лечебная и профилактическая эффективность пробиотиков «Лактимет» и «Бацинил». Оценку антагонистической активности проводили методом диффузии в агар в отношении патогенных и условно-патогенных возбудителей желудочно-кишечных инфекций телят и поросят (*E.coli* K 99:F41, *E.coli* O18, *Salm. tiphimurium*, *Proteus mirabilis*, *Past. haemolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Staph. aureus*). Объектом исследования служили 29 штаммов лактобактерий различных видов, 13 штаммов бифидобактерий и 35 штаммов бацилл (*Bac. subtilis* и *Bac. pumilis*). Исследование проводили с использованием мясоептонного агара. Продукты метаболизма лакто- и бифидобактерий получали путем глубинного культивирования их без аэрации на жидкой тиогликолевой среде, метаболиты бацилл получали после культивирования их на мясоептонном бульоне в течение 4-х дней, после чего проводили удаление бактериальных клеток центрифугированием и стерилизующей фильтрацией[2].

На поверхность застывшего 4%-го агара наносили культуру условно-патогенных тест-культур микроорганизмов в концентрации 100,0 – 500,0 млн. микробных тел, помещенных в 1,4-1,6% (мягкий) мясопептонный агар. После застывания агара в нем готовили лунки диаметром 9 мм и вносили изучаемые продукты метаболизма, при изучении антагонистической активности лакто- и бифидобактерий использовали пробойник для лунок диаметром 6 мм.

Итоговые данные изучения антагонистической активности штаммов бацилл в отношении тест-культур микроорганизмов представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Результаты изучения антагонистической активности штаммов бацилл в отношении тест-культур микроорганизмов (n=35), (диаметр пробойника 6 мм)**

Диаметр зоны задержки роста	Количество штаммов бацилл, обладающих антагонистической активностью						
	E.coli K 99:F41	E.coli O18	Salm. tiphimurium	Proteus mirabilis	Past. haemolytica	Klebsiella oxytoca	Staph. aureus
0-10	16/45,7	8/22,9	6/17,1	9/25,7	21/60,0	10/28,6	3/8,6
11-20	19/54,3	3/8,6	20/57,2	8/22,9	12/34,3	23/65,7	2/5,7
21-30	-	23/65,7	10/28,6	18/51,4	2/5,7	3/8,6	25/71,4
31 и >	-	1/2,9	-	-	-	-	5/14,3

Следующим этапом исследований явилось изучение антагонистической активности цельных и инактивированных кипячением метаболитов 6-ти наиболее активных штаммов бацилл (таблица 2).

**Таблица 2 - Изучение антагонистической активности цельных и инактивированных кипячением метаболитов штаммов бацилл (мм задержки роста)**

Тест-культура	Метаболит	Номер штамма Bacillus sp					
		№ 3	№ 9	№ 12	№ 23	№ 24	№ 31
E.coli K 99:F41	Цельный	11±0,2	22±0,3	20±0,15	13±0,15	20±0,3	19±0,3
	Инактивированный	10±0,1	14±0,15	20±0,2	18±0,15	14±0,1	16±0,15
E.coli O18	Цельный	26±0,3	17±0,2	19±0,15	28±0,3	20±0,25	17±0,15
	Инактивированный	10±0,2	18±0,15	16±0,1	18±0,2	21±0,25	15±0,12
Salm. tiphimurium	Цельный	14±0,15	23±0,2	17±0,1	25±0,3	27±0,4	18±0,15
	Инактивированный	20±0,2	18±0,15	15±0,12	20±0,2	14±0,12	18±0,15
Proteus mirabilis	Цельный	23±0,3	22±0,2	24±0,25	22±0,15	21±0,2	24±0,3
	Инактивированный	22±0,2	20±0,2	24±0,25	23±0,25	18±0,15	21±0,15
Past. haemolytica	Цельный	11±0,1	22±0,2	20±0,2	13±0,1	20±0,15	19±0,3
	Инактивированный	10±0,05	12±0,1	17±0,15	18±0,15	24±0,2	18±0,2
Klebsiella oxytoca	Цельный	17±0,15	22±0,18	20±0,2	18±0,15	23±0,25	20±0,2
	Инактивированный	18±0,15	18±0,2	19±0,22	22±0,25	21±0,2	19±0,15
Staph. aureus	Цельный	31±0,3	29±0,25	28±0,35	30±0,3	19±0,2	26±0,25
	Инактивированный	30±0,3	28±0,35	30±0,35	30±0,3	20±0,2	25±0,3

Изучение антагонистической активности цельных и инактивированных кипячением метаболитов 6-ти наиболее активных штаммов бацилл свидетельствует о том, что за антибактериальную активность метаболитов бацилл в основном отвечают термостабильные компоненты. Практически падение активности в отношении различных условно-патогенных бактерий невысокое – от 10 до 25%, а в некоторых случаях наблюдается даже увеличение на 10-15% (табл.2). Таким образом, бациллы обладают высокой антагонистической активностью в отношении различных условно-патогенных бактерий и их можно с успехом использовать как основу для конструирования экологически безвредных пробиотических препаратов.

Оценку антагонистической активности продуктов метаболизма лакто- и бифидобактерий, которые получали после культивирования их на модифицированной среде MRS в течение 48 часов с последующим удалением бактериальных клеток центрифугированием и стерилизующей фильтрацией также проводили методом диффузии в агар в отношении патогенных и условно-патогенных возбудителей желудочно-кишечных инфекций телят и поросят (E.coli O18, Salm.tiphimurium, Proteus mirabilis, Klebsiella oxytoca, Staph. aureus). Объектом исследования служили 42 штамма (род Lactobacillus sp. и Bifidobacterium).

**Результаты исследования.** Полученные результаты свидетельствуют, что основная часть изучаемых штаммов обладает устойчивой антагонистической активностью в отношении тест-культур условно-патогенных микроорганизмов. Зона задержки роста тест-культур основного количества штаммов (от 54 до 92%) составляет от 11 до 30.

Таким образом, из коллекции микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» отобраны 3 штамма бифидобактерий: Bifidobacterium adolescentis MC-42, Bifidobacterium adolescentis БИМ В-01, Bifidobacterium adolescentis БИМ В-87, 2 штамма лактобактерий: Lactococcus lactis subsp. lactis БИМ В-132, Lactobacillus casei subsp.rhamnosus БИМ В-189 и 6 штаммов бацилл: Bacillus subtilis 9/9, Bacillus subtilis 7/1, Bacillus subtilis 6/5, Bacillus subtilis 10/19, Bacillus subtilis 8/12, Bacillus pumilus.

В исследованиях патогенности, токсигенности и токсичности всех вышеперечисленных штаммов лакто-, бифидобактерий и бацилл было установлено, что изучаемые штаммы не являются патогенными, токсигенными,

не обладают токсичностью и могут использоваться в микробиологическом производстве.

Для изучения адгезивных свойств бацилл использовался экспресс-метод. Экспресс-метод предназначен для быстрого и одновременного определения адгезивных свойств большого числа штаммов микроорганизмов.

**Таблица 3 - Результаты изучения антагонистической активности штаммов лакто- и бифидобактерий в отношении тест-культур микроорганизмов (n=42), (диаметр пробойника 6 мм)**

Диаметр зоны задержки роста	Количество штаммов лакто- и бифидобактерий, обладающих антагонистической активностью				
	E. coli O18	Salm. tiphimurium	Proteus mirabilis	Klebsiella oxytoca	Staph. aureus
0-10	12/28,7	5/11,9	19/45,2	13/31,0	7/16,7
11-20	10/23,8	3/7,1	9/21,4	18/42,9	9/21,4

В качестве клеток макроорганизма при определении адгезивности микроорганизма использовали стабилизированные глютаровым альдегидом эритроциты барана и человека.

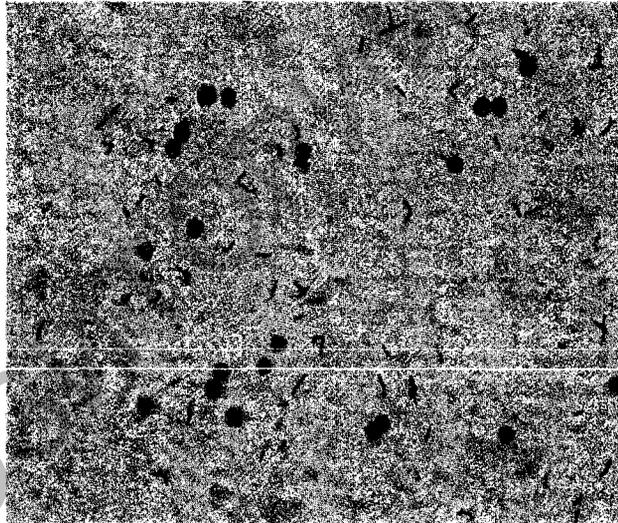
В качестве буфера использовался 0,1 М раствор фосфата натрия, приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия (pH 7,2—7,3).

Бациллы выращивали в течение 1-2 суток на мясопептонном агаре. Стабилизированные эритроциты предварительно дважды отмывали буферным раствором путем центрифугирования (300-1000 об/мин). На указанном буфере готовили взвесь эритроцитов концентрацией 3%.

Изучение адгезии вели под световым микроскопом. Адгезивные свойства оценивали с помощью среднего показателя адгезии (СПА). Под ним понимается среднее количество микробов, прикрепившихся к 1 эритроциту при подсчете не менее 25 эритроцитов, учитывая не более 5 эритроцитов в одном поле зрения. Адгезивность считают нулевой при СПА от 0 до 1,0, низкой - при СПА от 1,01 до 2,0, средней - от 2,01 до 4,0, высокой - свыше 4,0.

По результатам исследований адгезивных свойств 6-ти штаммов бацилл и 3-х штаммов бифидобактерий было определено, что они считаются неадгезивными – индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ) составил  $\leq 1,0$ . (рис. 1,2,3,4).

Лактобактерии являются высокоадгезивными микроорганизмами - индекс адгезии исследуемых молочнокислых бактерий составил свыше 4.



**Рисунок 1 - Адгезивные свойства бацилл**

Для изучения эффективности применения бесклеточных пробиотиков «Лактимет» и «Бацинилл» в условиях ЗАО «Липовцы» Витебской области было сформировано 5 групп больных энтеритами телят по 5 голов в возрасте до 20 дней, четыре опытных и одна контрольная.

Телятам опытной группы №1 вводили перорально «Лактимет» в дозе 10,0 мл на голову. Телятам опытной группы №2 вводили перорально этот же препарат в дозе 15,0 мл, телятам группы №3 - бесклеточный пробиотик на основе бацилл - «Бацинилл» в дозе 10,0 мл; телятам опытной группы №4 - пробиотик «Бацинилл» в дозе 15,0 мл. Препараты задавали животным 1 раз в сутки в течение 21 дня. Телята контрольной группы получали перорально физраствор в дозе 15,0 мл. Подопытные животные всех групп содержались в условиях технологии, принятой в хозяйстве. В период исследований проводился контроль за состоянием здоровья животных, при этом учитывалось общее состояние телят: аппетит, поедаемость кормов, двигательная активность.

В начале опыта и через 21 день у подопытных животных отбирались пробы крови для изучения динамики общего белка, бактерицидной и фагоцитарной активности сыворотки крови. Взятие крови осуществляли из яремной вены в стерильные пробирки с соблюдением правил асептики.

Для определения количественного состава бактерий в организме подопытных животных брали соскобы слизистой оболочки прямой кишки стерильным ватным тампоном в стерильные пробирки.

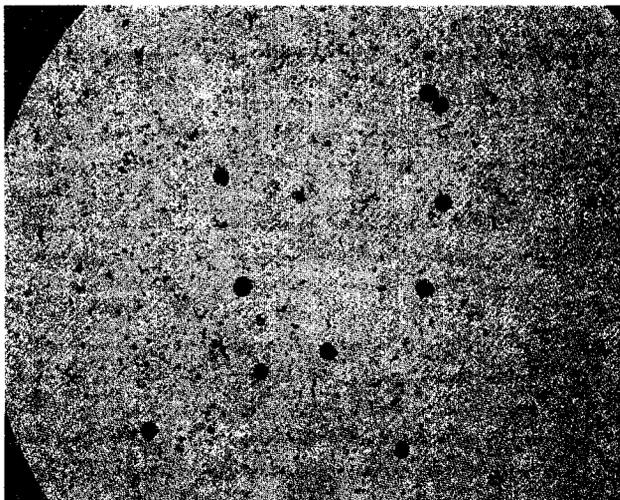


Рисунок 2 - Адгезивные свойства кишечной палочки K99 (положительный контроль)

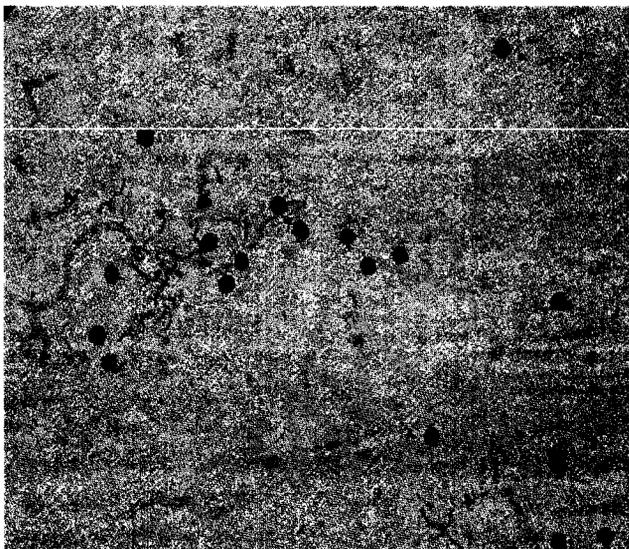


Рисунок 3 - Адгезивные свойства бифидобактерий

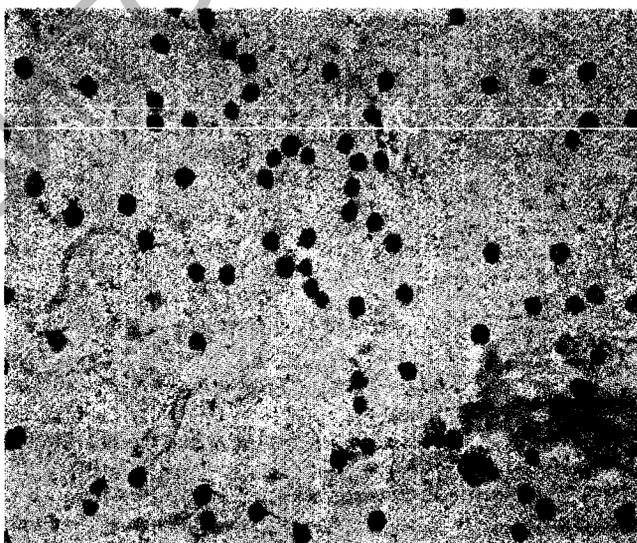


Рисунок 4 - Адгезивные свойства лактобактерий

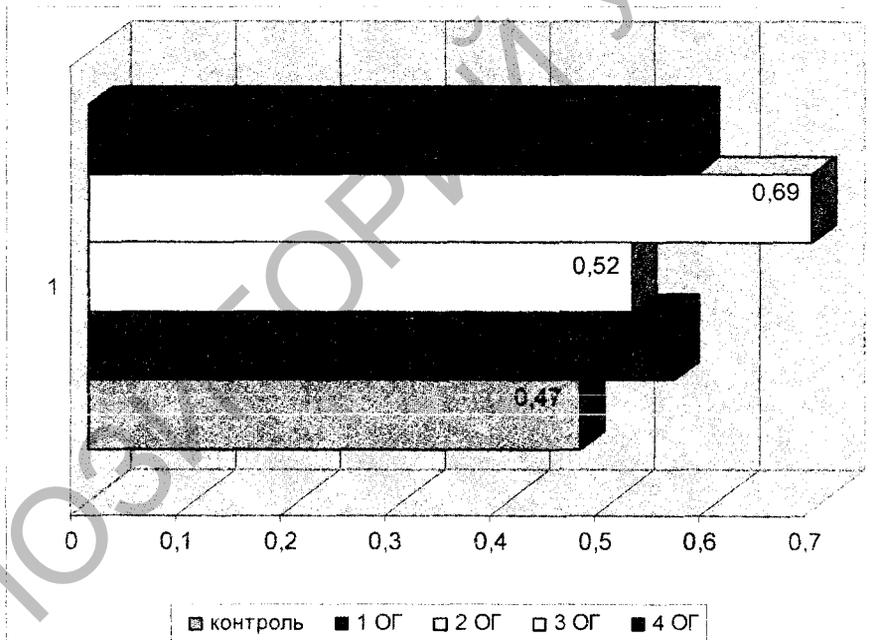
Бактерицидную активность сыворотки крови определяли фотонейлометрическим методом по О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой (1966). Общий белок в сыворотке крови определяли макробиуретовым методом, предложенным В.Г.Колбом и В.С.Камышниковым (1982). Белки сыворотки крови, реагируя в щелочной среде, образуют с сернокислой медью соединения, окрашенные в фиолетовый цвет. Испытуемые пробы колориметрировали на спектрофотометре «Metertech» SP8001. Фагоцитарную активность определяли по методике Н.С.Кисляк и Р.В. Ленской (1978) с помощью тест-культуры кишечной палочки.

Результаты ее эффективности в производственных условиях представлены в таблице 4.

**Таблица 4 - Эффективность применения пробиотических бесклеточных препаратов «Лактимет» и «Бацинил» телятам**

Показатели		Группа животных				
		Контроль	1 ОГ	2 ОГ	3 ОГ	4 ОГ
Препарат		УХ + Физ. р-р	УХ + «Лактимет»	«УХ + Лактимет»	УХ + «Бацинил»	УХ + «Бацинил»
Количество животных в группе, гол		5	5	5	5	5
Доза препарата, мл		-	10	15	10	15
Периодичность применения препарата		1 раз в день 21 день подряд				
Длительность заболевания, дней		9,2±0,7	5,0±0,43	4,4±0,86	5,2±0,4	4,0±0,86
Пало	гол.	1	0	0	0	0
	%	20	0	0	0	0
Повторно заболело	гол.	2	0	0	0	0
	%	40	0	0	0	0
Средняя масса животного, кг до применения пробиотиков		39,2	41	39,2	40,0	38,9
Средняя масса животного, кг после применения пробиотиков		49,1	52,8	50,2	54,6	51,2
Среднесуточный прирост, кг		0,47	0,56	0,52	0,69	0,58

Таким образом, из результатов проведенных исследований следует, что применение бесклеточных пробиотиков «Лактимет» и «Бацинил» в дозах 10,0-15,0 мл является действенным способом при профилактике и лечении желудочно-кишечных заболеваний телят, т.к. позволяет снизить заболеваемость на 40%, смертность на 20% и повысить среднесуточный прирост живой массы 1 головы на 117 граммов (19,9%) по сравнению с контролем (рисунок 5).



**Рисунок 5 – Среднесуточный прирост по группам (кг)**

Заболеваемость телят энтеритами часто сопровождается угнетением клеточного и гуморального иммунитета. При проведении исследований установлено, что показатели общего белка у больных животных в первый день исследований (начало болезни) находились в пределах верхней границы физиологической нормы (таблица 4, 5). Содержание общего белка на высоком уровне в этот период является относительным, что связано с изменением объема крови (увеличение гематокритной величины) в результате дегидратации организма.

При лабораторном исследовании установлено, что у телят опытных групп, которым задавались бесклеточные пробиотики «Лактимет» и «Бацинил», в конце опытного периода отмечалось снижение показателей общего белка. В опытных группах были достоверно ниже, чем в контрольной. Так, во второй опытной группе содержание общего белка уменьшилось с 69,75 до 64,16 г/л, а в четвертой – с 71,22 до 65,09 г/л или на 8,0 % и 8,6 % соответственно. В контроле содержание общего белка снизилось лишь на 1,2 %, что говорит о начале выздоровления.

Таблица 5 - Показатели естественной резистентности организма телят

Показатели	Номер опытной группы	Сроки исследования	
		Начало опыта 3-6 день жизни	Конец опыта 24-27 день жизни
Общий белок, г/л	Контроль	71,08 ± 1,08	70,29 ± 1,26
	I	69,55 ± 0,49	65,78 ± 1,1
	II	69,78 ± 1,00	64,16 ± 1,16
	III	70,17 ± 0,28	64,55 ± 1,00
	IV	71,22 ± 1,09	65,09 ± 0,84
Бактерицидная активность, %	Контроль	41,2±2,64	40,6±2,44
	I	43,2 ±2,21	43,9±2,77
	II	42,6±2,46	43,3±2,01
	III	41,9±2,67	42,0±2,52
	IV	42,0±2,36	43,1±2,87*
Фагоцитарная активность, %	Контроль	61,9±1,82	61,8±2,03
	I	61,4±2,17	65,4±2,05
	II	62,2±1,64	67,6±2,77*
	III	60,8±2,26	65,8±1,74
	IV	61,8±1,44	66,9±2,13*

\* - P&lt;0,05;

Использование пробиотических препаратов способствовало незначительному повышению бактерицидной активности сыворотки крови телят, в то время как в контроле он несколько снизился.

Одной из важнейших и наиболее изучаемых характеристик неспецифической резистентности организма является фагоцитарная активность клеток крови. Это форма защиты организма, при которой клетки - фагоциты захватывают проникающие в организм инородные частицы и переваривают их. В контрольной группе этот показатель остался практически на прежнем уровне. Хотя в опытных группах отмечалось достоверное повышение фагоцитарной активности лейкоцитов в среднем на 7,3%, максимальное значение 67,6% было отмечено в группе №2 (телята, получавшие по 15,0 мл пробиотика «Лактимет»), немного меньшее значение (66,9%) этот показатель составил в 4 группе (животные получали по 15,0 мл пробиотика «Бацинил»). В контрольной группе изменений фагоцитарной активности не наблюдалось.

При микробиологических исследованиях биоценоза желудочно-кишечного тракта у телят опытных групп видно, что у телят в конце эксперимента в содержимом кишечника преобладали бифидо- и молочнокислых бактерии  $10^8$  -  $10^{10}$  КОЕ/г, группа кишечной палочки была представлена в значительно меньшем количестве —  $10^3$  -  $10^4$  КОЕ/г, что является нормой. У телят контрольной группы при том же количестве бифидо- и лактобактерий, энтерококков отмечалось на 1-2 порядка выше.

**Заключение.** Использование бесклеточных пробиотиков «Лактимет» и «Бацинил» способствует повышению резистентности организма за счет повышения или снижения (в зависимости от состояния организма) общего белка, незначительного повышения бактерицидной активности сыворотки крови, а фагоцитарной активности лейкоцитов — на 7,3%.

**Литература.** 1. Бабина, М. П. Пробиотики в профилактике желудочно-кишечных заболеваний и гиповитаминозов животных и птицы: Аналит. обзор / М.П. Бабина, И.М. Карпуть // - Мн.: Белнаучцентр информмаркетинга АПК, 2001. - С. 11-16. 2. Ганина, В. И. Действие пробиотических продуктов на возбудителей кишечных инфекций / В.И. Ганина, Е.В. Большакова. - Молочная промышленность. - № 11. - 2001. - С. 47-48.

УДК 619: 616.98 : 579.842.11

#### ИЗГОТОВЛЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ОПЫТНОЙ СЕРИИ

Зайцев В.В.\*, Дремач Г.Э.\*\*, Горбунова И.А.\*, Соболев В.В., Билецкий О.Р.\*\*

\*УП «Витебская биофабрика»

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

*Изготовлена опытная серия гипериммунной сыворотки против колибактериоза сельскохозяйственных животных и проведен контроль ее качества. Установлено, что приготовленная сыворотка является стерильным, безвредным биопрепаратом и обладает высокой иммуногенной активностью.*

*Experimental series of hyperimmune serum against colibacteriosis of farm animals has been prepared and control of its quality has been done. It is established that prepared serum is sterile, harmless biopreparation and has high immunogenetic activity.*

**Введение.** Согласно данным Международного эпизоотического бюро (МЭБ) в настоящее время в мире насчитывается порядка 500 нозологических единиц инфекционных болезней, которые в современных условиях ведения животноводства причиняют хозяйствам значительный экономический ущерб [4].