

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИЗУЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Красочко П.А., Понаськов М.А., Мороз Д.Н.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь
e-mail: krasochko@mail.ru

Abstract: *The problem of pneumoenteritis of young cattle with a viral-bacterial etiology remains urgent and serious, despite the impressive arsenal of means to combat these diseases. At the moment, many different drugs have been created and are being used to treat and prevent pneumoenteritis in calves based on antibiotics, sulfanilamides, nitrofurans and their combinations. Their significant disadvantage is the reduction of their therapeutic effectiveness due to the emergence of resistant strains of microorganisms, the absence of antifungal action and their unsafe environmental situation. Their replacement belongs to probiotics, which find widespread use in the treatment of sick animals with impaired gut microbiocenosis, respiratory tract, as well as correction of microbiocenosis after the use of antibiotics. The purpose of the present studies is to study a comparative assessment of the biological activity of the probiotic preparation "BIFILIZ - N" using diffusion and spectrophotometric methods. It has been found that diffusion and spectrophotometric methods for evaluating antagonistic or biological microorganisms with test cultures are recommended to be used to evaluate the quality of the preparation.*

Keywords: *probiotics, activity, test cultures of microorganisms, antibiotic resistance.*

ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь в современных условиях животноводство ведется на промышленной основе. Но наряду с его высокой эффективностью имеются и отрицательные стороны. Это воздействие на животных стресс-факторов, нарушений микроклимата, полноценного кормления, что сопровождается снижением резистентности, повышением заболеваемости и т.д. На этом фоне животные, особенно молодняк, становятся более предрасположены к заболеваниям органов дыхания, пищеварения и т.д. [1, 3, 4].

На данный момент создано и применяется много различных препаратов для лечения и профилактики пневмоэнтеритов у телят. Эти лекарственные средства выпускаются в различных формах и содержат отдельные антибактериальные вещества (антибиотики, сульфаниламиды, нитрофураны) и их комбинации. Как правило, эти препараты дорогостоящие, не всегда дают желаемый результат. Существенными недостатками являются снижение их терапевтической эффективности в силу появления устойчивых штаммов микроорганизмов, отсутствие противогрибкового действия и небезопасность их в экологическом плане. Устойчивость к антибиотикам резко возрастает во всем мире. Поскольку все больше и больше бактерий становятся устойчивыми к антибиотикам, предназначенными для их уничтожения, они делают эти препараты неэффективными [1, 3, 4].

На современном этапе актуально применение пробиотических продуктов для сохранения правильного микробиоценоза органов дыхания и пищеварения у молодняка. В отличие от антибиотиков, эти препараты имеют антагонистическое воздействие на патогенные бактерии и это сохраняет собственную микрофлору тела животного [3].

В последние годы пробиотические препараты находят широкое применение для лечения больных животных с нарушением микробиоценоза кишечника, дыхательных путей, а также коррекции микробиоценоза после применения антибиотиков.

Для этого в ветеринарной практике широко применяются пробиотические препараты на основе лактобактерий, бифидобактерий, бацилл, эшерихий, пропионово-кислых бактерий и т.д.

В основе лечебного действия данных препаратов лежит антагонистическая активность продуктов метаболизма бактерий-симбионтов к условно-патогенной микрофлоре.

Для оценки антибактериальной (антагонистической, биологической) активности в основном применяют 2 вида тестов – (антагонистическая активность) по определению зоны задержки роста тест-культур вокруг лунок с пробиотическим препаратом [2] и (биологическая активность) с использованием метода оценки биологической активности препарата по измерению оптической плотности питательных сред при росте в нем тест-культур микроорганизмов с добавлением и без добавления испытуемого препарата [5].

Цель настоящих исследований - изучение сравнительной оценки биологической активности пробиотического препарата «БИФИЛИЗ - N» с использованием диффузионного и спектрофотометрического способов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в условиях кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней и отраслевой лаборатории ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины».

Объектом исследований служили препарат ветеринарный «БИФИЛИЗ - N» (производство ООО «Биофон-Вет»), представляет собой лизат бифидобактерий в культуральной жидкости.

Для определения антибактериальной активности препарата в отношении тест-культур *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111) диффузионным способом использованы автоклав, весы лабораторные с пределом взвешивания 200 г, термостат с диапазоном, рН-метр лабораторный, чашки Петри, пробирки стеклянные, мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера, агар питательный, тест-культуры бактерий – культуры *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111).

Плотную питательную среду на основе бульона Хоттингера с массовой долей агара 1,2 и 2% готовят по общепринятой методике. После стерилизации среду разливают, соблюдая правила асептики, по 20 см³ в 5 чашек Петри и оставляют для застывания среды.

Для получения тест-культур *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111) в колбы с 50 см³ стерильного мясо-пептонного бульона (рН 7,0) засевают 3-суточными культурами *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111), полученными на скошенном мясо-пептонном агаре.

Односуточные культуры тест-объекты *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111), выращенные на стерильном мясо-пептонном бульоне (рН 7,0), разливают по 5 см³ на поверхность питательной среды с массовой долей агара 2,0 % и оставляют для застывания.

Для оценки антибактериальной активности препарата стерильным пробочным сверлом из инокулированных бактериями *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111) агаровых пластинок вырезают диски диаметром 10 мм, получая на каждой чашке Петри по 2 симметрично располо-

женных отверстия, в которые вносят по 0,1 г препарата. После внесения жидкости в лунки чашки Петри осторожно устанавливают в холодильник для диффузии и спустя 5 ч переносят в термостат с температурой $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$. Через 24 ч измеряют диаметр образовавшихся вокруг лунок зон ингибирования роста тест-культуры.

Для определения биологической активности препарата спектрофотометрическим методом, основанном на измерении оптической плотности мясо-пептонного бульона (МПБ) при росте в нем микроорганизмов *Escherichia coli* КМИЭВ 39А и *Salmonella dublin* КМИЭВ В-111 используют стерильный МПБ, который стерильно с помощью стеклянных пипеток разливают по $4,5 \text{ см}^3$ в стерильные пробирки. Тест-культуры *Escherichia coli* КМИЭВ 39А и *Salmonella dublin* КМИЭВ В-111 выращивают на скошенном мясо-пептонном агаре. Для постановки реакции готовят микробную культуру следующим образом: смыв суточной агаровой культуры *Escherichia coli* (КМИЭВ 39А) и *Salmonella dublin* (КМИЭВ В-111) доводят до 2 млрд. микробных тел в 1 см^3 стерильного физиологического раствора. Затем $0,1 \text{ см}^3$ 2-миллиардной микробной взвеси вносят в $4,5 \text{ см}^3$ МПБ (суточная бульонная культура) и оставляют в термостате при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 ч. Как в опытные, так и в контрольные пробирки разливают по $0,1 \text{ см}^3$ суточной бульонной культуры.

Для проведения исследования в пробирки с $4,5 \text{ см}^3$ стерильного МПБ добавляют по $1,0 \text{ см}^3$ испытуемого препарата, затем стерильной пипеткой вносят по $0,1 \text{ см}^3$ взвеси бактериальных штаммов *Escherichia coli* КМИЭВ 39А или *Salmonella dublin* КМИЭВ - В111 с концентрацией клеток равной 20 единицам МОС. Используется не менее трех пробирок для каждого штамма соответственно. Для контроля используют пробирку с МПБ и соответствующим бактериальным штаммом, но без внесения испытуемого препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и стерильной пипеткой из каждой пробирки отбирают по $2,0 \text{ см}^3$ и вносят в кювету с рабочей длиной $(10,0 \pm 0,1)$ мм для измерения оптической плотности.

С помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра при длине волны 590 нм определяют ОП. Для контроля используют кювету с дистиллированной водой. Оставшееся в пробирках содержимое выдерживают в термостате при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 3 ч, и затем измеряют ОП с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра при длине волны 590 нм. При этом получают два показателя: первый характеризует оптическую плотность МПБ с препаратом и бактериальным штаммом сразу после смешивания; второй - оптическую плотность той же смеси после 3 ч инкубации в термостате. Биологическую активность препарата (БАП) в отношении к каждому из бактериальных штаммов вычисляют по формуле:

$$\text{БАП} = \frac{100}{100} \frac{D_2 - D_1}{D_4 - D_3} \times 100$$

где: D_1 – оптическая плотность МПБ с препаратом и бактериальным штаммом в начале опыта;

D_2 – оптическая плотность МПБ с препаратом и бактериальным штаммом через 3 ч термостатирования;

D_3 – оптическая плотность контроля в начале опыта;

D_4 – оптическая плотность контроля через 3 ч после термостатирования;

100 – максимально допустимое значение активности препарата, %.

В пробирках, куда добавляется препарат, микробы подвергаются бактерицидному и бактериостатическому воздействию, и оптическая плотность нарастает тем меньше, чем сильнее выражено это действие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовано 3 серии препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N». Оценку антибактериальной активности препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N» проводили по методам, описанным в разделе «Материалы и методы».

В таблицах 1 и 2 приведены сравнительные исследования диффузионного и спектрофотометрического методов антибактериальной активности препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N».

Таблица 1. Сравнительные исследования диффузионного и спектрофотометрического методов антибактериальной активности препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N» с использованием *Escherichia coli* КМИЭВ–39А

№ п/п	Серия препарата	Диффузионный метод (мм)	Спектрофотометрический метод (%)
1	№ 1/20	12	55
2	№ 2/20	13	60
3	№ 3/20	12	58

Таблица 2. Сравнительные исследования диффузионного и спектрофотометрического методов антибактериальной активности препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N» с использованием *Salmonella dublin* КМИЭВ - B111

№ п/п	Серия препарата	Диффузионный метод (мм)	Спектрофотометрический метод (%)
1	№ 1/20	14	60
2	№ 2/20	16	65
3	№ 3/20	15	60

Приведенные результаты исследований показали, что сравнительные исследования диффузионного и спектрофотометрического методов антибактериальной (антагонистической, биологической) активности препарата ветеринарного «БИФИЛИЗ - N» с использованием *Escherichia coli* КМИЭВ –39А и *Salmonella dublin* КМИЭВ - B111 *Escherichia coli* КМИЭВ –39А можно использовать для оценки качества препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота: монография. /П.А. Красочко [и др.]; под общ. ред. П.А.Красочко. - Смоленск: «Универсум», 2016. - 508 с.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации XI, вып. 2, стр. 210
3. Использование пробиотиков для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта и терапии животных / П.А. Красочко [и др.]// Утв. ГУВ МСХП РБ 21.06.2006 г. № 10-1-5/69. Изд. УО ВГАВМ, Витебск, 2006. – 86 с.
4. Красочко, П.А. Диагностика, профилактика и терапия респираторных желудочно-кишечных заболеваний молодняка /П.А. Красочко, И.А. Красочко // Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения Х.С. Горегляда и М.К. Юсковца. Минск, 1998. С. 15-18.
5. Патент Республики Беларусь № 19955 Способ определения антагонистической активности антибактериального бесклеточного пробиотического препарата / П.А. Красочко [и др.] / Заявл. № а20121083 от 19.07.2012г., Опубликовано: 07.12.2015, Минск, 2015. – 4 с