

**СПОРООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ КАК ОСНОВА
ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРИИ**

*Коломиец Э.И., доктор биологических наук, член-корреспондент
НАН Беларуси**

*Красочко П.А., доктор ветеринарных наук, профессор***

*Романовская Т.В., кандидат биологических наук**

*Бережная А.В., научный сотрудник**

*Камаева М.В., научный сотрудник**

*Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук***

*Голенкова М.П., младший научный сотрудник***

*Курочкин Д.В., аспирант***

*Карпович В.К., ветврач***

**ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»*

***РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»*

ВВЕДЕНИЕ

Пробиотики – это препараты на основе живых микроорганизмов и их метаболитов, оказывающие положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма-хозяина [1-3]. Благодаря преимуществам по сравнению с традиционно используемыми антибиотиками, они нашли широкое применение в ветеринарной практике, так как позволяют решить ряд проблем, возникающих при создании животноводческой продукции в условиях крупных ферм и хозяйств, в том числе таких, как повышение экономической эффективности животноводческого производства, преодоление антибиотикорезистентности патогенов, обеспечение экологической безопасности лекарственных препаратов. Важной особенностью пробиотиков является также их способность усиливать противoinфекционную устойчивость организма и оказывать противоаллергенное действие [4].

Наиболее известны в медицине и ветеринарии пробиотические препараты на основе бифидобактерий (Бифидумбактерин, Бификол, Бифилиз), лактобактерий (Лактобактерин, Ацилакт), кишечной палочки (Колибактерин, Биофлор) [5, 6]. В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают спорообразующие бактериантагонисты [6, 7]. Перспективность использования бактерий рода *Bacillus* обусловлена рядом преимуществ, в частности:

- данные микроорганизмы (за исключением *B. anthracis* и *B. cereus*), как правило, являются безопасными для макроорганизмов, являясь распространёнными представителями нормальной экзогенной микрофлоры, они не представляют экологической опасности при использовании;

- бактерии рода *Bacillus* характеризуются высокой антагонистической активностью к широкому спектру патогенных и условно патогенных микроорганизмов, благодаря чему по эффективности превосходят многих представителей экзогенной и эндогенной микрофлоры;
- бациллы обладают значительной ферментативной активностью, что может оказать положительное влияние на регулирование и стимулирование пищеварительных процессов, обусловить противоаллергенное и антиоксическое действие;
- данные бактерии демонстрируют высокую технологичность в процессе производства и стабильны при хранении [7].

В СНГ и странах дальнего зарубежья создано более полусотни лекарственных и профилактических средств на основе спорообразующих бактерий, в частности, БиоПлюс 2Б, Биоспорин, Бактерин-СЛ, гинеспорин, эндоспорин, БПС-44, Biosubtyl «Dalat», Glogen-8, Primalas, Protexin, Биосептин, Интестевит С, Бациллоспорин, Ветбактерин, Споровит [4-6, 8]. Однако следует отметить, что отечественные биопрепараты аналогичного действия отсутствуют, что ставит животноводческие отрасли сельского хозяйства Республики Беларусь в зависимость от зарубежных производителей и сказывается на экономической эффективности производства.

Вместе с тем, в связи с интенсификацией животноводства и снижением эффективности антибиотикотерапии отмечается увеличение количества инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, в частности, гнойно-некротических поражений крупного рогатого скота. По данным ортопедической клиники кафедры хирургии УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» из 2166 обследованных коров в хозяйствах республики выявлено 462 (23%) клинически больных животных с гнойными ранами, язвами и другими поражениями кожи. При гнойной патологии происходит снижение молочной продуктивности до 50% и более, к тому же полученное от больных коров молоко не пригодно в пищу. На 100 переболевших коров недополучается до 17 телят, приходится выбраковывать до 40% животных, уменьшается прирост живой массы. В связи с вышеуказанным, в процессе лечения гнойно-некротических болезней животных особое значение следует придавать поискам экологически чистых средств, которые способствуют ускорению очищения язвенной или раневой поверхности от гнойного экссудата, ранней ликвидации воспалительных явлений и более быстрому росту грануляций. Применение пробиотиков при гнойных процессах в ветеринарной медицине позволит открыть совершенно новое экологически чистое направление профилактики и лечения животных, что, несомненно, позволит получать высококачественную продукцию животноводства.

Гнойно-некротические заболевания имеют, как правило, полиэтиологическую природу и вызываются широким спектром патогенов.

Об этом свидетельствует выделение ассоциаций микроорганизмов - участников патогенеза при высеве анализируемого биологического материала. Наиболее типичными возбудителями инфекций являются бактерии родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Escherichia*, повсеместно распространённые на территории животноводческих комплексов [9]. Для контроля данных патогенов требуются антагонисты с широким спектром действия, что характерно для представителей бактерий рода *Bacillus*. Наряду с этим, согласно литературным данным, спорообразующие бактерии могут сохранять жизнеспособность в раневых тканях в течение нескольких суток, выделяя в очаге повреждения биологически активные вещества, а при разрушении являясь источником антигенов для поддержания нормального уровня антител. Способность бацилл стимулировать регенераторные процессы в тканях и оказывать выраженное лечебное действие обуславливает перспективность их использования не только для профилактики и лечения дисбактериозов, но и в хирургической практике [10, 11].

В связи с этим, целью настоящего исследования является выделение и скрининг спорообразующих бактерий – антагонистов патогенной микрофлоры, перспективных в качестве основы пробиотических препаратов, предназначенных для лечения гнойно-некротических заболеваний крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Спорообразующие бактерии-антагонисты выделяли из образцов почв, отобранных на территории животноводческого комплекса РУСПП «Свинокомплекс Борисовский». Для этого навески исследуемых образцов (1 г) заливали 30 мл физиологического раствора, затем интенсивно встряхивали 15 мин. Из полученных суспензий с использованием физиологического раствора готовили серию последовательных разведений (10^3 - 10^6) и по 0,1 мл из каждого разведения высевали на чашки с МПА 2% методом Коха, для определения общего числа микроорганизмов [12]. После прогревания разведений суспензии при 80 °С в течение 10 мин производили высеv спор бактерий на плотную агаризованную среду МПА 2% с целью получения изолированных колоний спорообразующих бактерий. Чашки инкубировали при 30 °С, по истечении 3 суток производили подсчет общего титра бактерий и титра спорообразующих бактерий. Из выросших колоний спорообразующих бактерий отбирали для дальнейшего анализа морфологически различающиеся типы. Из отобранных изолятов получали чистые культуры на чашках Петри с МПА 2% [13].

В качестве тест-объектов использовали представители патогенной микрофлоры из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» - культуры бактерий *Escherichia coli* A-20, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella dublin*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*

Первичный скрининг изолятов проводили методом точечного тестирования, позволяющего оперативно выявить антагонистическую активность большого количества испытуемых микроорганизмов [12]. Для этого на поверхность плотной питательной среды (МПА 2%) в чашках Петри наносили в виде точечных колоний определенное количество исследуемых бактериальных изолятов, выдерживали в термостате при 30 °С до развития колоний и заливали мягкой агаризованной средой (МПА 1,2%), предварительно инокулированной тест-объектами (патогенными бактериями). Чашки инкубировали при 30 °С до появления зон задержки роста тест-объекта и производили учет результатов.

Для изучения антагонистической активности методом лунок чашки Петри заливались МПА 1,2%, предварительно инокулированным тест-объектом в объеме 100 мкл/10 мл среды. Жидкую бактериальную культуру исследуемых штаммов вносили в количестве 100 мкл в лунки, вырезанные сверлом в агаризованной среде. Чашки инкубировали в течение 24 часов при температуре 30 °С. Результаты оценивали по диаметру зоны задержки роста тест-культуры вокруг лунки, содержащей исследуемый образец [12].

Для получения инокулята патогенных микроорганизмов штаммы тест-объектов выращивали поверхностным способом в пробирках со скошенным агаром МПА 2-% 1-3 суток, затем смывали с поверхности агара с помощью ФР и разводили до получения необходимой концентрации бактериальных клеток.

Жидкую культуру исследуемых бактерий получали глубинным методом в колбах Эрленмейера (250 мл) при температуре 30 °С в течение 3 суток на среде Мейнелла (50 мл) следующего состава: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ - 7,0 г; KH_2PO_4 - 3,0 г; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,1 г; $(NH_4)_2SO_4$ - 1,0 г; меласса свекловичная - 20 г; Na-цитрат $\cdot 3H_2O$ - 0,5 г; вода дистиллированная - 1 л.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Из 5 образцов почвы, взятой на территории животноводческого комплекса, выделено около 1000 изолятов спорообразующих бактерий, которые были оценены по способности к проявлению антагонизма в отношении микроорганизмов, вызывающих гнойно-некротические поражения животных. На первом этапе в качестве патогена использовали культуру *Staphylococcus sp.*, которая является типовым тест-объектом для выявления антагонистической активности исследуемых культур в отношении этого заболевания. Первичный отбор выделенных бактерий проводили методом точечного тестирования. В результате выявлено около 50 изолятов, проявляющих антагонистическую активность в отношении *Staphylococcus sp.*

При оценке бактериальных изолятов в отношении широкого спектра патогенов, содержащихся в некротическом экссудате и раневых

ВЕТЕРИНАРНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ И САНИТАРИЯ

тканях (*Kl. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, *S. dublin*, *St. aureus*, *E. coli A-20*), было выявлено 7 наиболее активных антагонистов, ингибирующих рост большинства испытанных тест-объектов (таблица 1).

Таблица 1 – Антагонистическая активность изолятов спорообразующих бактерий, выделенных из образцов почвы (метод точечного тестирования)

Тест-объект	Диаметр зоны задержки роста патогена, мм						
	II-10	I ₂ -17	I-III 5-S	I-III 16-S	I-III 18-S	II-9-S	II-10-S
<i>St.aureus</i>	12	20	-	-	-	10	-
<i>Ps.aeruginosa</i>	10	9	10	9	10	10	9
<i>Kl.pneumonia</i>	-	-	9	-	-	-	10
<i>S.dublin</i>	20	18	10	9	10	10	11
<i>E.coli A-20</i>	10	26	10	10	11	-	-

На следующем этапе отбора бактериальные изоляты выращивали в глубинной культуре (на МПБ) и оценивали их антагонистическую активность методом лунок, основанном на диффузии антимикробных метаболитов в агар. С использованием данного метода было показано, что наиболее значительные зоны задержки роста патогенных бактерий образуют изоляты II-10 и I₂-17 (таблица 2).

Таблица 2 – Антагонистическая активность отобранных изолятов спорообразующих бактерий (метод лунок)

Тест-объект	Диаметр зоны задержки роста патогена, мм	
	II-10	I ₂ -17
<i>St.aureus</i>	17±1	19±3
<i>Ps.aeruginosa</i>	12±2	10±1
<i>Kl.pneumonia</i>	11±1	10±1
<i>S.dublin</i>	18±2	19±2
<i>E.coli A-20</i>	22±1	15±1

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Выбор территории, на которой проводился отбор проб, основывался на предположении о высокой микробной обсеменённости почв вблизи мест массового содержания сельскохозяйственных животных. Во всех пяти проанализированных образцах почв, отобранных на животноводческом комплексе, отмечена высокая численность микрофлоры - общий титр бактериальных клеток составил $6 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, причем количество спорообразующих бактерий составляло более 50 % от общей численности бактерий.

Из общего числа полученных спорообразующих бактерий около 50 изолятов в той или иной степени проявляли антагонистическую активность против патогенных бактерий рода *Staphylococcus*. Путем поэтапного скрининга с использованием различных методов, основанных на диффузии метаболитов в агар, были отобраны два изолята (II-10, I₂-17), активных в отношении выделенных из биологического материала патогенных бактерий, являющихся возбудителями сальмонеллёза, коли-

бактериоза, стафилококкоза, псевдоманоза, клебсиеллёза, а также ассоциативных бактериозов и сепсисов (*E. coli A-20*, *Kl. pneumonia*, *Ps. aeruginosa*, *S. dublin*, *St. aureus*, *Staphylococcus sp.*).

При скрининге штаммов, предназначенных для создания пробиотического препарата ветеринарного назначения, целесообразным является использование нескольких методов тестирования антагонистической активности, а также применение в качестве тест-объектов широкого спектра патогенов. Такой подход позволяет целенаправленно получить наиболее перспективные штаммы-антагонисты – основу эффективных пробиотических препаратов комплексного действия для борьбы с инфекционными заболеваниями сельскохозяйственных животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бондаренко, В.М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В.М. Бондаренко, А.А. Воробьев // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
2. Бондаренко, В.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.
3. Floch, M.H. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders / M.H. Floch, J. Hong-Curtiss // Curr. Gastroenterol. Rep. – 2001. – Vol. 3, №4 – P. 343–350.
4. Данилевская, Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков / Н.В. Данилевская // Ветеринария. – 2005. – № 11. – С. 6–10.
5. Похиленко, В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин // Химическая и биологическая безопасность – 2007. – № 2–3. – С. 20–41.
6. Грачева, Н.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника / Н.М. Грачева, В.М. Бондаренко // Инфекц. бол. – 2004 – №2. – С. 53–58.
7. Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов / И.Б. Сорокулова // Антибиотики и химиотерапия – 1996.– Т. 41, № 10. – С. 13–15.
8. Малик, Н.И. Ветеринарные пробиотические препараты / Н.И. Малик, А.Н. Панин // Ветеринария. – 2001. – № 1. – С. 46–51.
9. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*, используемые в качестве компонентов препарата против вирусных и бактериальных инфекций, и препарат на основе этих штаммов: пат. РФ № 2142287, кл. А61К35/74, С12N1/20, С12R1:07, С12R1:10, С12R1:125 / Щелкунов С.Н., Петренко В.А., Рязанкина О.И. и др.; заявитель ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», ТОО НПФ «Исследовательский центр»; заявл. 16.12.1997; опубл. 10.12.1999.

10. Никитенко, В.И. Некоторые новые данные о механизме действия спорообразующих пробиотиков / В.И. Никитенко, А.В. Бородин, М.В. Никитенко // Актуальные вопросы военной и практической медицины: Сб. трудов научно-практической конференции врачей Приволжского военного округа. – Оренбург, 2000.<http://esculapus.h1.ru>
11. Смирнов, В.В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты / В.В. Смирнов // Мед. картотека. – 1998. – № 8.
12. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги – Москва, 1983. – Гл.7. – С. 166–168.
13. Выделение и идентификация микроорганизмов: учеб.-метод. пособие / Авт.-сост. Р.А. Желдакова. – Мн.: БГУ, 2003. – С. 6–9.