

УДК 619:579.852.11:615.33:638.1

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЕВРОПЕЙСКОГО ГНИЛЬЦА *PAENIBACILLUS ALVEI* К ПРЕПАРАТУ «ГЕНТАВЕТ»

Дунец Е.Н., Герасимчик В.А.

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

При определении чувствительности возбудителя европейского гнильца к препарату «Гентавет» *in vitro* установлено, что средство проявляет бактериостатический эффект при концентрации действующего вещества 0,22 мг/мл и разведении препарата 1:196 608.

Determining susceptibility of the European Faulbrut causative agent to Gentavet in vitro has revealed the bacteriostatic effect at the drug content of about 0.22 mg/ml and its dilution of 1:196 608.

Введение. Микроорганизмы, вызывающие инфекционные болезни у пчелиных семей, подразделяются на две группы: патогенные для взрослых особей пчелосемьи (пчел, трутней, маток) и патогенные для расплода (пчелиного, трутневого и маточного) [3, 9].

Наибольшую опасность вызывают болезни расплода – гнильцовые болезни (американский гнилец, европейский гнилец и парагнилец). Возбудителей гнильцовых болезней можно обнаружить почти на каждой пасеке [3]. Появление клинических признаков болезней зависит от иммунного статуса пчелиной семьи, сезона года, наличия в природе взятка и т.д. Болезни, проявляющиеся эпизоотически, наносят огромный экономический ущерб пчеловодству, т. к. снижают продуктивность пчелиных семей до 80 % и более. Сильно пораженные пчелосемьи погибают в течение одного сезона [3, 4].

Распространение гнильцовых болезней на пасеках обусловлено устойчивостью возбудителей во внешней среде. При неблагоприятных условиях микроорганизмы рода *Bacillus* образуют споры, что снижает эффективность лечебно-санитарных мероприятий на пасеке.

Чаще всего на пасеках распространены возбудители европейского гнильца.

Европейский гнилец – инфекционная болезнь открытого расплода, сопровождающаяся массовой гибелью личинок 3–4-х и даже 7-дневного возраста.

Известно несколько возбудителей европейского гнильца: *Melissococcus pluton* (*Streptococcus pluton*) – неподвижные анаэробные грамположительные ланцетовидные, вытянутой формы микроорганизмы; *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus apis*), *Bacillus laterosporus* (*Bacillus orpheus*), *Achromobacter eurydice* и *Paenibacillus alvei* (*Bacillus alvei*) – подвижные аэробные грамположительные бактерии, некоторые из них образуют споры [3, 4, 9, 10]. На пасеках Республики Беларусь очень часто выделяют *Paenibacillus alvei*.

Европейский гнилец трудно поддается лечению. Необходимо длительное время проводить лечение пчелосемей. Среди лечебных средств широко используют антибактериальные препараты. Чаще всего из них применяют средства, действующим веществом которых является тетрациклин. При длительном применении этой группы антибиотиков на одной пчелопасеке возбудитель европейского гнильца приобретает устойчивость. В связи с этим необходимо изыскивать новые средства для борьбы с возбудителями гнильцовых болезней пчел. В лаборатории при исследовании патологического материала определяют чувствительность возбудителей болезней к различным бактерицидам [2, 5, 6, 11, 12].

Целью наших исследований явилось определение чувствительности возбудителя европейского гнильца *Paenibacillus alvei* к препарату «Гентавет».

Диагноз на европейский гнилец ставили с учетом данных эпизоотической ситуации, клинических признаков и лабораторных исследований погибших пчелиных личинок.

Материал и методы. Материалом для исследования явилась культура возбудителя европейского гнильца *Paenibacillus alvei*, выделенная из погибших пчелиных личинок пчелосемьи, принадлежащей ГПУ «Березинский биосферный заповедник» Лепельского района Витебской области. Культура была изолирована в лаборатории кафедры микробиологии и вирусологии УО «ВГАВМ».

Чувствительность *P. alvei* определяли к антибактериальному препарату «Гентавет», выпущенному УП «Витебский завод ветеринарных препаратов» в стеклянных флаконах по 100 мл. Препарат представляет собой прозрачную жидкость с желтоватым оттенком со специфическим запахом; изготовлен 1.12.2008 г; срок годности до 1.12.2010 г; ТУ 9337-031-3196803-00. В одном мл препарата «Гентавет» содержится 40 000 мг действующего вещества – гентамицина сульфата.

При определении чувствительности возбудителя *P. alvei* к гентавету руководствовались «Методическими указаниями по определению чувствительности к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней сельскохозяйственных животных» (Утверждены Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 30 октября 1971 г.) [1, 6, 7, 8].

Для определения чувствительности *P. alvei* к гентавету *in vitro* использовали метод последовательных серийных разведений антибиотика в пробирках на жидкой питательной среде – мясопептонном бульоне (МПБ). Растворы антибиотика готовили в пробирках с тем расчетом, чтобы чувствительность исследуемого препарата приблизительно приходилась на середину ряда. С помощью метода последовательных разведений антибиотика определяли бактериостатическую концентрацию действующего вещества препарата «Гентавет» к культуре *P. alvei*. Для этого брали 25 стерильных пронумерованных пробирок, выставленных в штативе по порядку, в которые вносили по 3 мл стерильного МПБ. В первую пробирку первого ряда пастеровской пипеткой вносили 3 мл препарата «Гентавет», перемешали содержимое пробирки, затем 3 мл полученного содержимого перенесли во вторую пробирку, снова перемешали и 3 мл переносили в третью и т.д. Перенесение содержимого из предыдущей пробирки в последующую повторяли до тех пор, пока все 25 пробирок не были заполнены разведениями антибиотика. Таким образом, получили двукратные разведения испытуемого средства на МПБ.

При смешивании МПБ: в 1-ой пробирке препарат был разведен 1:2; во 2-ой – 1:4; в 3-ей – 1:8; в 4-ой – 1:16; в 5-ой – 1:32 и т. д. – в 25-ой пробирке – 1:33 554 432. Первоначальная концентрация действующего вещества в неразведенном препарате «Гентавет» соответствовала 0,04 г (40 000 мкг) гентамицина сульфата в одном мл. При разведении антибиотика концентрация в пробирках уменьшалась с увеличением разведения в них. В первой пробирке концентрация действующего вещества снизилась до 20 000 мкг в одном мл; во второй пробирке приравнялась 10 000 мкг; в третьей – 5 000 мкг и т.д. В 25-ой пробирке концентрация гентамицина сульфата соответствовала 0,001 мкг в одном мл. Затем в каждую пробирку внесли по 0,05 мл смыва с 18-часовой агаровой культуры *P. alvei*, содержащей 1 млн. микробных клеток в одном мл среды, которое определяли с помощью оптического стандарта мутности.

В опыте использовали два контроля: пробирка № 1 содержала разведение антибиотика без культуры *P. alvei*, пробирка № 2 содержала 3 мл стерильного МПБ и 0,05 мл 18 часовой 1 млн. агаровой культуры *P. alvei*.

Пробирки с разведениями антибиотика и контрольные выдерживали в термостате при температуре + 37,5 °С 24 часа. По истечении указанного времени определяли бактерицидную концентрацию гентавета к *P. alvei*: отмечали пробирку, в которой отсутствовал рост культуры. Показатель концентрации испытуемого препарата в пробирке суммировали с количеством антибиотика в следующей пробирке (имеется рост культуры), затем выводили среднее арифметическое значение. Полученное число показывало чувствительность культуры *P. alvei* к определенному разведению препарата «Гентавет». Для более точного результата делали посевы на МПА из каждой пробирки. Отсутствие роста указывало на бактерицидную концентрацию антибиотика; минимальный рост – бактериостатическое действие; сплошной рост *P. alvei* – разведение антибиотика не действует.

Из выросших колоний готовили препараты – мазки, которые окрашивали по Граму и исследовали в световом микроскопе ($\times 100$) с использованием иммерсионной системы. С помощью микроскопического исследования препаратов-мазков определяли морфологические свойства обнаруженных возбудителей. Результаты сравнивали с препаратом-мазком, сделанным из контрольной пробирки, в которой культивировали *P. alvei*.

Результаты исследований. Результаты исследований учитывали визуально через 24 часа.

В пробирках №№ 1–17 отсутствовал рост *P. alvei*. Разведения в этих пробирках оставались прозрачными с желтоватым оттенком, при встряхивании которых помутнения в средах не наблюдали. В данных пробирках гентавет оказывал бактерицидное действие на возбудителя европейского гнильца. В препаратах-мазках, сделанных из пробирок №№ 1–17 и окрашенных по Граму, *P. alvei* не обнаружен (таблица 1) и бактерии не выросли при посеве на МПА. В пробирке № 17 концентрация гентамицина сульфата соответствовала 0,3 мкг в одном мл разведения и препарат оказывал бактерицидное действие на *P. alvei*.

В пробирках №№ 18, 19 и 20 отмечали незначительный рост культуры *P. alvei*. На МПА выросло небольшое количество колоний возбудителя болезни. В этих пробирках антибиотик «Гентавет» действует бактериостатически. При встряхивании пробирок наблюдалось поднятие косички со дна пробирки и легкое помутнение среды (рисунок 1). При микроскопии препаратов-мазков, сделанных из пробирок и окрашенных по Граму, выявлено сходство бактерий по морфологическим признакам с возбудителем *P. alvei* (таблица 1). В пробирках №№ 18, 19 и 20 появился рост возбудителя, т. к. концентрация антибиотика в пробирке № 18 составляла 0,15 мкг в одном мл разведения, а в других пробирках и того меньше, что недостаточно для проявления бактерицидного действия препарата.

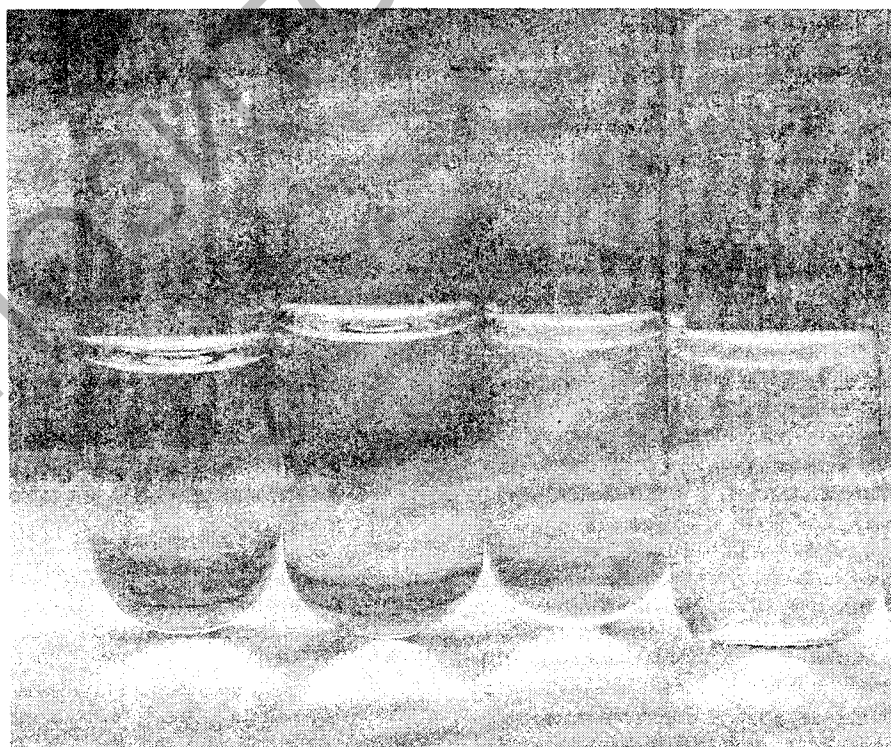


Рисунок 1 – Помутнение среды при серийном разведении препарата «Гентавет»; слева направо: пробирки №№ 17, 18, 19 и 20

В пробирках №№ 21–25 разведения антибиотика 1:2 097 152 и более не действуют на возбудителя европейского гнильца *P. alvei*. В этих пробирках отмечали сильное помутнение среды, при встряхивании наблюдалась косичка, поднимающаяся к поверхности среды. При высевах на МПА выросли многочисленные колонии. В мазках обнаружен возбудитель, аналогичный по морфологическим признакам бактериям *P. alvei*.

Контрольная пробирка № 1 с разведением гентавета, но без культуры оставалась чистой; при встряхивании – бульон не мутнел. В контрольной пробирке № 2, содержащей 3 мл стерильного МПБ, в которую высевали *P. alvei*, наблюдалось сильное помутнение и при встряхивании пробирки со дна ее поднималась мощная косичка. При посевах на МПА обнаружили сплошной рост возбудителя. При исследовании культурально-морфологических, биохимических свойств бактерий была идентифицирована как культура европейского гнильца *P. alvei*.

Таблица 1 – Чувствительность возбудителя европейского гнильца *P. alvei* к препарату «Гентавет» *in vitro*

№ пробирки	Двукратное разведение препарата «Гентавет» в МПБ	Концентрация действующего вещества препарата «Гентавет» в 1 мл разведения, мкг	Добавление чистой бульонной культуры <i>P. alvei</i> , 0,05 мл	Наличие роста <i>P. alvei</i> в пробирке
1	1:2	20 000	+	-
2	1:4	10 000	+	-
3	1:8	5 000	+	-
4	1:16	2 500	+	-
5	1:32	1 250	+	-
6	1:64	625	+	-
7	1:128	312,5	+	-
8	1:256	156,25	+	-
9	1:512	78,12	+	-
10	1:1 024	39,06	+	-
11	1:2 048	19,53	+	-
12	1:4 096	9,76	+	-
13	1:8 192	4,88	+	-
14	1:16 384	2,44	+	-
15	1:32 768	1,22	+	-
16	1:65 536	0,61	+	-
17	1:131 072	0,3	+	-
18	1:262 144	0,15	+	+-
19	1:524 288	0,07	+	+-
20	1:1 048 576	0,03	+	+-
21	1:2 097 152	0,01	+	+
22	1:4 194 304	0,0087	+	+
23	1:8 388 608	0,0043	+	+
24	1:16 777 216	0,0021	+	+
25	1:33 554 432	0,001	+	+
Контроль 1	1:67 108 864	0,0005	-	-
Контроль 2	-	-	+	+

При вычислении бактериостатической концентрации препарата «Гентавет» по отношению к возбудителю болезни использовали пробирки №№ 17 и 18 с концентрацией антибиотика в одном мл разведения 0,3 мкг (разведение 1:131 072) и 0,15 мкг (1:262 144) соответственно. Следовательно, бактериостатическая концентрация исследуемого препарата к *P. alvei* будет соответствовать 0,22 мкг/мл. Отсюда следует, что 1 мл препарата «Гентавет» необходимо развести в 196 л жидкой питательной среды, чтобы получить концентрацию антибиотика 0,22 мкг/мл, действующего бактериостатически на чистую культуру европейского гнильца *P. alvei* в лабораторных условиях.

Заключение. Чувствительность возбудителя европейского гнильца *Paenibacillus alvei*, выделенного из погибшего расплода пчелосемьи, к препарату «Гентавет» на жидкой питательной среде *in vitro* имеет следующие показатели:

- препарат «Гентавет» оказывает губительное действие на возбудителя европейского гнильца *P. alvei* в концентрации 0,3 мкг/мл при максимальном разведении 1:131 072;
- антибиотик проявляет бактериостатическое действие на *P. alvei* в концентрации 0,15 мкг/мл при разведении 1:262 144;
- антибактериальное средство не действует на *P. alvei* в концентрации 0,01 мкг/мл при разведении 1:2 097 152 и выше;
- общий бактериостатический эффект гентавет проявляет при концентрации действующего вещества в препарате 0,22 мкг/мл при разведении 1:196 608.

Препарат «Гентавет» может быть рекомендован в качестве лечебного средства для пчелосемей, больных европейским гнильцом, вызванным возбудителем *Paenibacillus alvei*.

Литература. 1. Антонов, Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии: биохимические и микологические: Справочник / Б.И. Антонов, Т.Ф. Яковлева, В.И. Дерябина и др.; под ред. Б.И. Антонова // М.: Агропромиздат, 1991. – 287 с. 2. Буза, Л. Медикаменты, применяемые в профилактике болезней пчел в Венгрии / Л. Буза // Апиомондия. 22 Международный конгресс по пчеловодству (доклады). Мюнхен, 1–7 августа 1969. Бухарест-Румыния. – С. 73–75. 3. Кириевский, И.Р. Болезни

пчел / И.Р. Кириевский // М.: САТ; Донецк: Сталкер, 2006. – 303 с. 4. Кокорев, Н. Болезни и вредители пчел / Н. Кокорев, Б. Чернов // М.: ТИД Континент-Пресс, Континенталь-Книга, 2006. – 352 с. 5. Куликов, Н.С. Лечение европейского гнильца пчел опрыскиванием и опыливанием сотов антибиотиками и норфазолнатрием / Н.С. Куликов // 18 Международный конгресс по пчеловодству. – М. – С. 174. 6. Махова, М. Чувствительность и реакция на различные антибиотики отдельных штаммов *Bacillus larvae* / М. Махова // Апиомондия. 22 Международный конгресс по пчеловодству (доклады). Мюнхен, 1–7 августа 1969. Бухарест-Румыния. – С. 125–126. 7. 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 «ПИОН», 2002. – 248 с. 8. Солонко, А.А. Практикум по микробиологии / А.А. Солонко, А.А. Гласкович, Ф.Е. Тимофеев // Мн.: Дизайн ПРО, 1998. – 192 с. 9. Тимофеев, Ф.Е. Болезни пчел / Ф.Е. Тимофеев // Мн.: «Ураджай», 2000. – 182 с. 10. Херольд, Э. Новый курс пчеловодства / Э. Херольд, К. Вайс; пер. с нем. М. Беляева // 10-е изд., перераб. – М.: САТ: Астрель, 2008. – 368 с. 11. Чанышев, З.Г. Применение сульфамидных препаратов и антибиотиков для профилактики и лечения смешанной инфекции – американского и европейского гнильцов / З.Г. Чанышев // 18 Международный конгресс по пчеловодству. – М. – С. 157. 12. Маслій, І.Г. Порівняльна оцінка ефективності фармацевтичних препаратів відносно збудників інфекційних хвороб бджіл / І.Г. Маслій // Вет. медицина. – 2000. – Вип. 77. – С. 242–247.

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕПТОСПИРОЗНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Зайцев В.В.

УП «Витебская биофабрика»,
г. Должа, Республика Беларусь

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии различий серологических свойств лептоспир, выращенных как на общепринятых, так и экспериментальных средах на основе сывороток крови барана.

The results show a serological difference of leptospirae grown on conventional and experimental media derived from ram's blood.

Введение. Любая микробиологическая работа и, следовательно, выполнение любой практической задачи связаны с приготовлением питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма. Среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки, – источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы.

Синтетические возможности микроорганизмов и способы получения ими энергии разнообразны. Следовательно, и очень различны их потребности в источниках питания. Отсюда ясно, что универсальных сред, пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует. Разнообразие обмена веществ микроорганизмов проявляется прежде всего в их отношении к источникам углерода и азота; вот почему эти элементы представлены в средах различными веществами и именно они определяют специфичность сред.

Автотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода углекислоту воздуха или карбонатов, тогда как потребности в углероде гетеротрофных микроорганизмов такими соединениями углерода не могут быть удовлетворены. Для развития гетеротрофных микроорганизмов среда должна содержать более восстановленные соединения углерода, которые в зависимости от физиолого-биохимических особенностей организма могут быть представлены различными органическими соединениями, например кислотами, спиртами, углеводами, углеводородами.

Неодинаковы требования микроорганизмов и к источнику азота. Для культивирования микроорганизмов, фиксирующих молекулярный азот, используют среды, не содержащие соединений азота. В состав всех других сред входят различные азотсодержащие соединения. Это могут быть нитраты или соли аммония, одна или несколько аминокислот. Наконец, известны микроорганизмы, нуждающиеся в полном наборе аминокислот или белках.

Потребности разнообразных групп микроорганизмов в зольных элементах и микроэлементах удовлетворяются обычно за счет одних и тех же минеральных солей. Поэтому так называемый «минеральный фон» сред для многих микроорганизмов может быть очень близким по составу.

Кроме элементов, необходимых для конструктивных процессов, среда должна содержать и энергетический материал. В средах для культивирования гетеротрофных организмов соединения углерода в большинстве случаев являются и энергетическим материалом. В средах для хемоавтотрофных организмов эту роль выполняют минеральные соли.

Из вышесказанного ясно, что при составлении сред следует обязательно учитывать особенности обмена веществ микроорганизмов. Кроме того, среды одного и того же микроорганизма могут быть разными в зависимости от задач исследования. Например, среда для длительного сохранения микроорганизма в лабораторных условиях заметно отличается от сред, предназначенных для получения тех или иных продуктов обмена веществ.

Однако какой полноценной ни была бы среда, ее компоненты могут остаться недоступными, если активная кислотность среды (рН) не соответствует значениям, при которых возможно развитие изучаемых организмов. Поэтому, приготовив среду, проверяют значение рН и, если необходимо, доводят его до нужной величины растворами кислот, щелочей или солей, имеющих щелочную реакцию. В процессе стерилизации значение рН может изменяться, поэтому нередко требуется дополнительное определение его в стерильных средах и в случае надобности корректирование стерильными растворами кислоты или щелочи.