

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS*

N.V. Donkova, S.A. Donkov

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF AMYLOLYTIC STRAINS OF BACTERIA *BACILLUS SUBTILIS*

Донкова Н.В. – д-р вет. наук, проф., зав. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkova N.V. – Dr. Vet. Sci., Prof., Head, Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: dnv-23@mail.ru

Донков С.А. – канд. биол. наук, доц. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkov S.A. – Cand. Biol. Sci., Assoc. Prof., Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: dnv-23@mail.ru

В зимне-стойловый период заболеваемость телят, вызываемая энтеропатогенными микроорганизмами, в хозяйствах может достигать 70 %. Для лечения и профилактики применяются антибиотики, сульфаниламидные, нитрофурановые препараты, а также биопрепараты – вакцины и специфические сыворотки, а в последние годы предлагаются препараты, изготовленные на основе пробиотиков – микроорганизмов-антагонистов по отношению к энтеропатогенным бактериям. Одним из таких микроорганизмов является спорообразующая палочка – *Bacillus subtilis*. Целью нашего исследования являлось изучение антагонистической активности амилотических штаммов № 2 – *amylolytic*, № 9 – *amylolytic* и № 12 – *amylolytic* *Bac. subtilis* по отношению к таким видам энтеропатогенных микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus pneumoniae*. Исследования проведены в лабораторных условиях методом культивирования амилотических штаммов на плотных питательных средах, содержащих один из видов энтеропатогенных микроорганизмов. Антагонистическую активность оценивали по диаметру зон лизиса вокруг растущих колоний амилотических штаммов. Установлено, что различные амилотические штаммы микроорганизма *Bac. subtilis* облада-

ют различной антагонистической активностью по отношению к различным видам энтеропатогенных микроорганизмов. По уровню антагонистической активности по отношению к энтеропатогенным микроорганизмам амилотические штаммы выстраиваются в следующем возрастающем порядке: № 2 – *amylolytic*, № 9 – *amylolytic*, № 12 – *amylolytic*. По степени устойчивости к амилотическим штаммам энтеропатогенные микроорганизмы располагаются в следующем убывающем порядке: *S. dublin*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa* и *Str. pneumoniae*. Амилотические штаммы являются пробиотиками и могут быть использованы в животноводстве для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний у молодняка сельскохозяйственных животных, вызванных энтеропатогенными бактериями.

Ключевые слова: энтеропатогенные бактерии, антагонистическая активность, амилотические штаммы *bacillus subtilis*.

In winter-stall period, the incidence of disease in calves caused by enteropathogenic microorganisms, the farms can achieve 70 %. For the treatment and prevention of used antibiotics, sulfa, nitrofurans preparations, and biological products – vaccines and specific serum, and in recent years has offered the preparations made on the basis of pro-

biotics – microorganisms - antagonists against enteropathogenic bacteria. One of such microorganisms is a spore-forming Bacillus Bacillus subtilis. The purpose of our research was to study the antagonistic activity of amylolytic strains No. 2-amylolytic, No. 9-amylolytic and No. 12-amylolytic Bac. subtilis with respect to such types of enteropathogenic microorganisms, such as Escherichia coli, Salmonella dublin, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus pneumoniae. The research was conducted in the laboratory by culture of amylolytic strains on dense nutrient media containing one of the types of enteropathogenic microorganisms. Antagonistic activity was assessed by the diameter of zones of lysis around colonies growing amylolytic strains. It was established that different strains of amylolytic microorganism Bac. subtilis had different antagonistic activity against various types of enteropathogenic microorganisms. The level of antagonistic activity against enteropathogenic microorganisms amylolytic strains was in the following ascending order: No. 2-amylolytic, No. 9-amylolytic, No. 12-amylolytic. The degree of resistance to amylolytic strains of enteropathogenic microorganisms was arranged in the following descending order: S. dublin, E. coli, Pr. vulgaris, Ps. aeruginosa and Str. pneumoniae. Amylolytic strains are probiotics and can be used in livestock for treatment and prevention of gastrointestinal diseases in young farm animals caused by enteropathogenic bacteria.

Keywords: enteropathogenic bacteria, antagonistic efficiency, amylolytic strains bacillus subtilis.

Введение. Термин «пробиотики» был предложен в 1977 году Л. Ричард и Р. Паркер для обозначения живых микроорганизмов и продуктов их ферментации, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенным микроорганизмам и обеспечивающих равновесие кишечной микрофлоры.

Для отбора штаммов микроорганизмов в качестве пробиотиков предложено несколько критериев – это апатогенность, специфическое окрашивание по Граму, резистентность к желчи, органическим кислотам и окислителям, устойчивость к ряду антибиотиков, колонизация и (или) адгезия к клеткам слизистой оболочки пищеварительного тракта, а также наличие антагонистических свойств по отношению к энтеро-

патогенным микроорганизмам. Важна также технологичность, т. е. способность к быстрому накоплению биомассы, устойчивость к лиофильному высушиванию, жизнеспособность при хранении [4].

Препараты-пробиотики, изготавливают из живых антагонистически активных бактерий, являющихся представителями нормальной микрофлоры кишечника человека и животных – кишечной палочки (колибактерин), бифидобактерий (бифидумбактерин, бифидумбактерин форте, бифилиз), смеси кишечной палочки и бифидобактерий (бификол), лактобактерий (лактобактерин, ацилакт, аципол). В последние годы для лечения дисбактериозов в лечебную практику были внедрены отечественные препараты, изготовленные на основе живых апатогенных антагонистически активных представителей рода *Bacillus*: споробактерин, бактиспорин, биоспорин [3].

В медицине на основе различных штаммов *Bac. subtilis*, изолированных из почвы, выпускают ряд лечебных препаратов («Споробактерин», «Биоспорин», «Бактиспорин»), которые применяются для лечения желудочно-кишечных расстройств [6]. Кроме перечисленных выше лекарств-пробиотиков, штаммы *Bacillus subtilis* входят в состав пищевых добавок, таких как «Бактистатин», «Супрадин», «Ветом» и другие. Для ветеринарии и сельского хозяйства также используются штаммы *Bac. subtilis* в ряде лекарств и продуктов. В частности, пробиотик «Субтилис» (жидкая форма «Субтилис-Ж» и порошок «Субтилис-С»), включающий в свой состав микробную массу живых бактерий, применяется в животноводстве, птицеводстве, рыбноводстве для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ бактериальной этиологии, дисбактериоза, легочных инфекций, увеличения продуктивности, получения здорового потомства, подавления роста патогенных и условно патогенных микроорганизмов (сальмонеллы, кишечной палочки, аэромонад, псевдомонад, протей, синегнойной палочки и других) [2, 5].

Антагонизм пробиотиков основан на преобладании их в конкурентной борьбе с условно-патогенными микроорганизмами за среду обитания, в частности за питательные вещества в пищеварительном тракте. На этом основан лечебно-профилактический эффект пробиотиков.

Заболевания желудочно-кишечного тракта у молодняка животных могут вызываться не только кишечной палочкой, но и несколькими видами микроорганизмов одновременно. В этом случае говорят об ассоциированных инфекциях. В ассоциации могут входить в различных сочетаниях такие энтеропатогенные микроорганизмы, как кишечная палочка (*Escherichia coli*), сальмонелла (*Salmonella dublin*), протей (*Proteus vulgaris*), синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), стрептококк (*Streptococcus pneumoniae*) и другие.

В животноводстве применение пробиотиков имеет большое значение для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний у молодняка крупного рогатого скота. Заболевание колибактериозом может возникать у телят в течение первого месяца после рождения. Телята, начиная с 10–14-дневного возраста, постепенно переходят от молочного типа кормления к поеданию растительного корма, в частности сена. С переходом на питание растительным кормом желудочно-кишечный тракт телят постепенно заселяется бактериями вида *Bacillus subtilis* (сенная палочка), которая становится постоянным обитателем рубца. Основная роль этой бактерии – это расщепление крахмала до простых сахаров за счет выделения ею амилолитического фермента. В научной литературе обсуждается роль *Bac. subtilis* как антагониста по отношению к энтеропатогенным микроорганизмам и целесообразность скармливания телятам пробиотика, созданного на основе этой бактерии [4]. Его применение способствует нормализации микробиального состава желудочно-кишечного тракта, что является наиболее физиологически адекватным методом профилактики у телят желудочно-кишечных заболеваний.

Цель исследования: изучение антагонистической активности амилолитических штаммов *Bacillus subtilis* по отношению к некоторым видам энтеропатогенных бактерий. В связи с этим мы ставили перед собой на разрешение следующую **задачу:** изучить рост колоний амилолитических штаммов *Bacillus subtilis*

на плотных питательных средах, содержащих различные виды энтеропатогенных микроорганизмов.

Объект и методика исследования. Изучение антагонистической активности амилолитических штаммов бактерии *Bacillus subtilis* по отношению к энтеропатогенным бактериям проводили в условиях лаборатории ветеринарной медицины Красноярского НИИЖа и в Научно-исследовательском испытательном центре Красноярского ГАУ. В качестве испытуемых микроорганизмов использовали три штамма бактерии *Bacillus subtilis* – это шт. № 2-amylolytic, № 9-amylolytic и № 12-amylolytic. Микроорганизмы были выделены из предоставленного нами материала в ФГУП ГосНИИ Генетика (Москва) и приняты на национальное патентное депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Там же было установлено, что штаммы продуцировали амилолитический фермент.

В качестве тестовых использовали следующие музейные культуры энтеропатогенных микроорганизмов – это *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus pneumoniae*.

В качестве плотной питательной среды использовали среду Сабуро. Культивирование микроорганизмов производили в термостате при $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Антагонистическую активность оценивали на плотных питательных средах по диаметрам зон лизиса вокруг колоний амилолитических штаммов.

Подготовку к опытам проводили следующим образом. Расплавленную питательную среду Сабуро наливали в чашку Петри и на стадии ее застывания в стерильных условиях добавляли в нее суточную культуру одного из видов энтеропатогенных бактерий. Покачиванием чашки Петри равномерно распределяли микроорганизмы по всей среде, а после застывания среды в нее методом лунок делали посев культуры одного из амилолитических штаммов *Bacillus subtilis*.

Схема опытов представлена в таблице 1.

Схема опытов на плотной питательной среде Сабуро

Штамм в питательной среде	Амилолитические штаммы <i>Bacillus subtilis</i> , добавляемые в чашку Петри		
<i>E. coli</i>	шт. № 2-amyloitic	шт. № 9-amyloitic	шт. № 12-amyloitic
<i>S. dublin</i>	шт. № 2-amyloitic	шт. № 9-amyloitic	шт. № 12-amyloitic
<i>Pr. vulgaris</i>	шт. № 2-amyloitic	шт. № 9-amyloitic	шт. № 12-amyloitic
<i>Ps. aeruginosa</i>	шт. № 2-amyloitic	шт. № 9-amyloitic	шт. № 12-amyloitic
<i>Str. pneumoniae</i>	шт. № 2-amyloitic	шт. № 9-amyloitic	шт. № 12-amyloitic

Всего в опытах было использовано 15 чашек Петри. Наблюдение за ростом культур вели в течение 5 дней, замеры диаметра зон лизиса производили при помощи разработанной нами компьютерной программы для измерения морфометрических показателей. Контролем служили чашки Петри с питательной средой Сабуро, которые не содержали энтеропатогенные микроорганизмы, но в которые были засеяны какой-либо из амилолитических штаммов.

Микроскопию и фотографирование изучаемого материала проводили при помощи микроскопа МИКМЕД-6 с тринокулярной насадкой и цифрового фотоаппарата Canon-A520, имеющего программное обеспечение для компьютерной обработки получаемых изображений.

Для статистического анализа полученных данных использовали математические функции, заложенные в электронных таблицах Ms.Excel.

Результаты исследований. На рисунке 1 представлена чашка Петри со средой Сабуро, в которую была внесена культура кишечной палочки. Видны как единичные, так и разлитые колонии, которые являются результатом слияния мелких колоний в более крупные.

На рисунке 2 представлена чашка Петри со средой Сабуро, содержащей кишечную палочку и в которой методом лунок в 3 местах был посеян амилолитический штамм № 12.



Рис. 1. Среда Сабуро, содержащая колонии кишечной палочки (контроль)



Рис. 2. Зоны лизиса вокруг колоний амилолитического шт. № 12-amylolitic на среде Сабуро, содержащей кишечную палочку

Результаты исследований, характеризующие динамику образования зон лизиса вокруг колоний амилолитических штаммов в плотных питательных средах, в которых содержатся энтеропатогенные микроорганизмы, представлены в таблицах 2–4.

Таблица 2

Динамика изменения зоны лизиса вокруг культуры амилолитического шт. № 2-amylolitic на среде Сабуро, содержащей один из энтеропатогенных микроорганизмов, мм ($M \pm m$)

Дни культивирования	Вид энтеропатогенного микроорганизма, содержащегося в среде				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1	0	0	0	0	0
2	1,5±0,03	1,0±0,02	2,0±0,03	2,0±0,03	2,0±0,03
3	4,0±0,05	2,5±0,04	4,5±0,06	4,5±0,06	5,0±0,07
4	6,0±0,08	5,0±0,08	6,5±0,09	7,0±0,11	8,5±0,12
5	8,0±0,11	7,5±0,10	9,0±0,14	11,5±0,18	12,0±0,19

Таблица 3

Динамика изменения зоны лизиса вокруг культуры амилолитического шт. № 9-amylolitic на среде Сабуро, содержащей один из энтеропатогенных микроорганизмов, мм ($M \pm m$)

Дни культивирования	Вид энтеропатогенного микроорганизма, содержащегося в среде				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1	0	0	0	0	0
2	3,0±0,04	3,0±0,04	2,5±0,04	3,0±0,05	3,0±0,04
3	6,0±0,06	6,0±0,06	5,0±0,05	6,5±0,07	6,5±0,07
4	12,0±0,09	11,5±0,09	9,0±0,08	11,0±0,10	12,0±0,11
5	16±0,14	17,5±0,15	14±0,013	15,5±0,13	18,0±0,16

Динамика изменения зоны лизиса вокруг культуры амилитического шт. № 12-amyloplitic на среде Сабуро, содержащей один из энтеропатогенных микроорганизмов, мм ($M \pm m$)

Дни культивирования	Вид энтеропатогенного микроорганизма, содержащегося в среде				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
1	0	0	0	0	0
2	3,5±0,05	4,0±0,06	4,5±0,06	5,0±0,07	5,0±0,08
3	8,0±0,09	9,0±0,10	12,0±0,11	14,0±0,14	14,5±0,15
4	11,5±0,11	14,0±0,14	19,5±0,18	20,0±0,18	21,0±0,19
5	17±0,15	19±0,18	25±0,22	27,0±0,25	28,0±0,28

Из данных таблиц 2–4 видно, что амилитические микроорганизмы, засеянные на плотные питательные среды, в составе которых имелись различные виды энтеропатогенных бактерий, обладают различной антагонистической активностью по отношению к исследуемым видам энтеропатогенных бактерий. Наибольшие диаметры зон лизиса на 5-й день роста были отмечены вокруг культуры шт. № 12, меньше зоны лизиса были вокруг культуры шт. № 9 и наименьшие – вокруг культуры шт. № 2. При этом отмечено, что все амилитические штаммы давали наибольшую зону лизиса при росте на среде с *Str. pneumoniae*, а наименьшую – *S. dublin* и *E. Coli*.

Выводы

1. Амилитические штаммы № 2, 9 и 2 микроорганизма *Bacillus subtilis* растут на плотных питательных средах, содержащих различные виды энтеропатогенных бактерий. Вокруг колоний амилитических штаммов образуются зоны лизиса, что говорит о лизисе (гибели и растворении) энтеропатогенных бактерий вокруг растущих колоний амилитических штаммов.

2. Амилитические штаммы № 2, 9 и 12 микроорганизма *Bacillus subtilis* обладают антагонистической активностью по отношению к таким видам энтеропатогенных бактерий, как *Escherichia coli*, *Salmonella dublin*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus pneumoniae*.

3. По уровню антагонистической активности по отношению к энтеропатогенным бактериям амилитические штаммы располагаются в следующем возрастающем порядке: № 2-amyloplitic, № 9-amyloplitic, № 12-amyloplitic.

Предложение производству: использовать амилитические штаммы № 2, 9 и 12 микроор-

ганизма *Bacillus subtilis* в качестве пробиотиков для лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, вызываемых энтеропатогенными бактериями.

Литература

1. Данилевская Н.В., Сидоров М.А., Субботин В.В. Пробиотики в ветеринарии // Ветеринария. – 2002. – № 11.
2. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3 (32–33) – С. 20–41.
3. Самторов Н.Р. Технология производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и их лечебно-профилактическая эффективность при инфекционных энтеритах телят: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – Душанбе, 2012. – 36 с.
4. Ткачева И.В., Тищенко Н.Н. Применение пробиотических препаратов «Субтилис» и «СУБ-Про» в комбикормах для осетровых // Тр. Кубанского гос. аграр. ун-та. – 2011. – № 1 (28). – С. 122–124.
5. Ушкалова Е.А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии // Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 16–23.

Literatura

1. Danilevskaja N.V., Sidorov M.A., Subbotin V.V. Probiotiki v veterinarii // Veterinarija. – 2002. – № 11.
2. Pohilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotiki na osnove sporoobrazujushih bakterij i ih bezopasnost' // Himicheskaja i biologicheskaja bezopasnost'. – 2007. – № 2–3 (32–33) – С. 20–41.

3. Sattorov N.R. Tehnologija proizvodstva probiotikov na osnove Bacillus subtilis i ih lechebno-profilakticheskaja jeffektivnost' pri infekcionnyh jenteritah teljat: avtoref. dis. ... d-ra vet. nauk. – Dushanbe, 2012. – 36 s.
4. Tkacheva I.V., Tishhenko N.N. Primenenie probioticheskikh preparatov «Subtilis» i «SUB-Pro» v kombikormah dlja osetrovyyh // Tr. Kubanskogo gos. agrar. un-ta. – 2011. – № 1 (28). – S. 122–124.
5. Ushkalova E.A. Rol' probiotikov v gastrojenterologii // Farmateka. – 2007. – № 6. – S. 16–23.



УДК:619:618.11-089.87+636.92:612.11/12

**В.А. Воскобойник, И.Ю. Цымбал,
А.Н. Квочко**

ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРОЛИКОВ ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ЯИЧНИКА

**V.A. Voskoboynik, I.Y. Tsymbal,
A.N. Kvocho**

DYNAMICS OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN RABBITS AFTER RESECTION OF OVARY

Воскобойник В.А. – асп. каф. физиологии, хирургии и акушерства Ставропольского государственного аграрного университета, г. Ставрополь. E-mail: voskoboynik-fvm@yandex.ru

Цымбал И.Ю. – студ. 5-го курса Ставропольского государственного аграрного университета, г. Ставрополь. E-mail: abagri@mail.ru

Квочко А.Н. – д-р биол. наук, проф., зав. каф. физиологии, хирургии и акушерства Ставропольского государственного аграрного университета, г. Ставрополь. E-mail: kvochko@yandex.ru

Voskoboynik V.A. – Post-Graduate Student, Chair of Physiology, Surgery and Obstetrics, Stavropol State Agrarian University, Stavropol. E-mail: voskoboynik-fvm@yandex.ru

Tsymbal I.Yu. – 5-year Student, Stavropol State Agrarian University, Stavropol. E-mail: abagri@mail.ru

Kvocho A.N. – Dr. Biol. Sci., Prof., Head, Chair of Physiology, Surgery and Obstetrics, Stavropol State Agrarian University, Stavropol. E-mail: kvochko@yandex.ru

Гематологическими исследованиями выявлено изменение параметров крови кроликов после резекции яичников, раны которых ушиты рассасывающимися хирургическими нитями (кетгут и «Аллоплант»). Установлено, что у животных, у которых использовался в качестве шовного материала для закрытия раны яичника нить кетгута, наблюдалось увеличение количества лейкоцитов к шестым суткам после операции (на 29,0 %) в сравнении с данными до операции. Количество эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина и гематокритное число на шестой день после частичной резекции яичника достоверно

уменьшилось на 24,0; 20,0; 14,0 и 14,0 % соответственно в сравнении с дооперационными значениями. В дальнейшем эти параметры изменялись волнообразно и приблизились к дооперационным значениям только к двадцать четвертому дню после хирургического вмешательства. У животных, которым для закрытия раны яичника после частичной его резекции использовали нити «Аллоплант», на шестой день после операции количество лейкоцитов и тромбоцитов достоверно увеличилось на 15,5 и 21,0 % соответственно в сравнении с дооперационными значениями. Содержание гемоглобина и гематокритное число в