

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.27.51,68.41.35

К.Б. Бияшев¹, Г.М. Нургожаева¹, С.С. Кошкимбаев¹,
К.Т. Жуманов¹, В.Ю. Тыницкая¹, С.Р. Баймолда¹

¹Казахский национальный аграрный университет, г.Алматы, Казахстан

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСОБЕННОСТЬ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА *ESHERICHIA COLI* 64Г

Аннотация. При отборе культур для приготовления пробиотиков следует помнить, что они должны обладать набором свойств, позволяющих им конкурировать с патогенными и условно патогенными микроорганизмами и соответствовать определенным требованиям: являться нормальными обитателями желудочно-кишечного тракта здоровых животных; быть непатогенными и нетоксичными; переносить пассаж через желудок (обладать определенным уровнем устойчивости к желчи и соляной кислоте); обладать способностью к адгезии на эпителии и приживлению в пищеварительном тракте; антагонистической активностью и быть стабильными и способными длительное время оставаться жизнеспособными при хранении в производственных условиях. Изучен спектр антагонистической активности и устойчивости к действию желудочного сока и желчи полученного пробиотического штамма *E.coli* 64Г ставшего основой для изготовления пробиотического препарата «Энтерокол».

Ключевые слова: штамм, антагонистическая активность, устойчивость, желчь, соляная кислота.

• • •

Түйіндеме. Пробиотиктерді дайындау үшін есінділерді сұрыптауда олар зардапты және шартты-зардапты микроорганизмдермен бөсекеге қабілетті және белгілі талаптарға сәйкес келетін мынадай жинаққа: дені сау жануардың ішек-қарын жолының қалыпты микрофлорасын қалыптастыру, зардапсыз, усыз, қарын арқылы пассаж өткізу (тұз және өт қышқылына белгілі бір деңгейде танылатын төзімділік), асқорыту жолында тіршілік ету және эпителияға адгезивті қасиетке ие, антагонисті белсенділік және тұрақтылық, өндірістік жағдайда сақтау кезінде тіршілігін ұзақ сақтау қасиеттеріне ие болуы тиіс. «Энтерокол» пробиотикалық препаратын дайындауға негіз болған *E.coli* 64Г пробиотикалық штаммының асқазан сәлі мен өт жұмысына антагонисті белсенділік және тұрақтылық спектрі зерттелді.

Түйінді сөздер: штамм, антагонисті белсенділік, төзімділік, өт, тұз қышқылы.

Abstract. When selecting crops for the preparation of probiotics, it should be remembered that they must have a set of properties that allow them to compete with pathogenic and opportunistic microorganisms and meet certain requirements: to be normal inhabitants of the gastrointestinal tract of healthy animals; be non-pathogenic and non-toxic; transfer the passage through the stomach (have a certain level of resistance to bile and hydrochloric acid); have the ability to adhere to the epithelium and engraft in the digestive tract; antagonistic activity and to be stable and able to remain viable for a long time during storage in production conditions.

Keywords: strain, antagonistic activity, resistance, bile, hydrochloric acid.

Введение. Основой профилактики инфекций новорожденных животных, вызываемых возбудителями инфекционных болезней, является серо- и вакцинопрофилактика. Однако, в связи со сложившейся в настоящее время экономической ситуацией (вступление в ВТО, создание конкурентоспособной продукции), которая диктует поиск новых методов профилактики болезней животных, возникает ряд затруднений при использовании традиционной иммунизации. Слабые иммуногенные свойства вакцин могут привести к прорывам иммунитета у иммунизированных животных. В этой связи становится целесообразным применение новых методов профилактики болезней животных с использованием свойств некоторых групп бактерий продуцировать бактериоцины.

В настоящее время предложено множество различных видов пробиотиков, продуцирующие бактериоцины, состоящих из монокультур и ассоциаций различных групп бактерий. Вместе с тем низкая эффективность этих препаратов может быть обусловлена тем, что при их разработке не учитываются экологические критерии селекции штаммов. Во многих публикациях акцентируется внимание на том, что штаммы для изготовления ветеринарных пробиотиков должны быть выделены из кишечника животных, что является обоснованным, так как целью применения пробиотиков является восстановление нормального микробиоценоза желудочно-кишечного тракта животных с учетом их физиологических особенностей [1]. Включение пробиотиков в систему выращивания молодняка животных снижает заболеваемость желудочно-кишечными болезнями, сокращает продолжительность выращивания, снижает затраты на корма. Пробиотики улучшают убойные и мясные качества молодняка сельскохозяйственных животных и птиц [2].

Эти препараты не имеют противопоказаний к применению и в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями могут положительно влиять на организм животного. При использовании этих препаратов стимулируется иммунный ответ организма животных, возобновляется нормобиоценоз, при этом продукты животноводства остаются экологически чистыми [3].

Механизм действия пробиотиков проявляется в их способности активно заселять желудочно-кишечный тракт, производить биологически активные метаболиты, которые обеспечивают их выживаемость в борьбе с патогенными микроорганизмами, устойчивость к действию желудочного сока и желчи [4].

При подборе полезных микроорганизмов следует учитывать много условий. Подбирать штаммы необходимо из большого количества бактерий, которые обладают высокой скоростью роста и быстро приживляются в среде желудочно-кишечного тракта [3].

Работа выполнялась в соответствии с планом грантового проекта AP05132442 «Разработка технологии изготовления пробиотического препарата «Энтерокол» и создание его опытно-промышленного образца».

Цель работы - Изучить спектр антагонистической активности и устойчивости к действию желудочного сока и желчи пробиотического штамма *E.coli* 64Г.

Методы исследований. Исследования проводились в лаборатории противобактериозной биотехнологии КазНАУ. Объектом исследования явился штамм *E.coli* 64Г, используемый для изготовления пробиотика «Энтерокол».

Основные результаты. Одной из наиболее ценных свойств пробиотических препаратов является их антагонистическая активность по отношению к патогенным условно - патогенным микроорганизмам.

Антагонистическую активность изучали на плотных питательных средах. О степени антагонистической активности изучаемых препаратов к каждому тест-микробу судили по ширине зоны задержки роста последнего: до 10 мм-средняя, более 20 мм - высокая; отсутствие зоны задержки роста - нулевая антагонистическая активность.

Антагонистическую активность препарата определяли в отношении тест-культур: *E.coli*, *Salm.typhimurium*, *Salm.dublin*, *Salm.*

choleraesuis, *Salm.abortusovis*. *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis*.

В качестве тест-культур были взяты культуры в хозяйствах Алматинской области, изолированные от больных животных и обладающие патогенными свойствами. Антагонистическую активность сухого препарата «Энтерокол» изучали в сравнении с препаратом «Олин» (Россия), содержащий культуры *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis*.

Антагонистическую активность определяли микробиологическим способом – методом диффузии в агар (метод лунок). В чашках Петри, засеянных тест-культурами, сделали лунки. В лунки вносили суспензию из сухих препаратов «Энтерокол» и «Олин» (таблица 1).

Результаты определения антагонистической активности препарата свидетельствуют, что препарат «Энтерокол» и «Олин» подавляют рост всех исследованных тест-культур, причем зоны задержки роста тест - культур составляют 25-32 мм.

Таблица 1 - Антагонистическая активность препарата «Энтерокол»

| Препараты | Диаметр зон подавления роста тест-культур (мм) | | | | | | | | | |
|-----------|--|------------------------|-----------------------|------------------------|---------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>S. dublin</i> | <i>S. abortus ovis</i> | <i>S. typhimurium</i> | <i>S. choleraesuis</i> | <i>E.coli</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Stap. aureus</i> | <i>Strep. pneumoniae</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>B. subtilis</i> |
| Энтерокол | 23 | 28 | 27 | 30 | 31 | 26 | 27 | 32 | 31 | 30 |
| Олин | 22 | 28 | 26 | 29 | 31 | 25 | 27 | 30 | 31 | 30 |

Определение чувствительности препарата «Энтерокол» к желчи, соляной кислоте. Суспензию исследуемого препарата «Энтерокол» культивировали на МПБ (рН 7.0-7.4), содержащей 1, 5, 10, 20, 30 и 40% желчи. В экспериментах использовали препарат желчи медицинский (*Cholemedicata*), содержащий натуральную пузырную желчь крупного рогатого скота.

Суспензию исследуемого препарата «Энтерокол» культивировали в течение 24 и 48 ч. Устойчивость к желчи определяли по уровню накопления биомассы, изменению числа КОЕ и рН среды. Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл суспензии (число колониеобра-

зующих единиц – КОЕ) определяли методом предельных разведений (от 10^2 до 10^9) при высеве на плотные питательные среды (МПА). Показания снимали непосредственно после внесения суспензии культур разных разведений на МПА через 24 культивирования их в термостате при 37°C в течение 18-20 ч. Затем проводился подсчет выросших колоний. Аналогичный опыт был проведен после культивирования суспензии исследуемого препарата «Энтерокол» в течение 48 ч. в МПБ.

Результаты исследования показали, что при высеве суспензии исследуемых культур в разведении - 10^2 на МПА (определение живых клеток), выросших в МПБ с содержанием различных концентраций желчи через 24 и 48 ч. наблюдался рост штаммов *E.coli* 64Г со сред содержащих 1%, 5%, 10% и 20% желчи. Наибольшая биомасса наблюдалась на 1 сут. (через 24 ч.) культивирования, титр бактерий (КОЕ) равнялся при высеве в разведении: 10^2 (100 КОЕ) – штамм *E.coli* 64Г- 85 - 90 КОЕ из 100. Титр бактерий при высеве исследуемых культур через 48 ч. равнялся в среднем 65-74 КОЕ из 100.

Рост штамма *E.coli* 64Г на средах, содержащей 30 и 40% желчи не наблюдался. Безусловно, применение препарата «Энтерокол» на основе штамма *E.coli* 64Г способствует нормализации кишечной микрофлоры и активизации обмена веществ в организме животных.

Определение чувствительности штамма *E.coli* 64Г к соляной кислоте проводили фотокалориметрическим методом по изменению оптической плотности бульонных культур при добавлении различных концентраций соляной кислоты, которая сравнивалась с контролем, где наблюдалось размножение исследуемых культур в средах без наличия соляной кислоты. В качестве эталонной культуры использовали штамм *E.coli* 04 (S – форма).

Одновременно, устойчивость к соляной кислоте исследуемых культур эшерихий определяли по уровню накопления биомассы, изменению числа КОЕ и pH среды. Количество жизнеспособных клеток бактерий в 1 см^3 суспензии (число колониеобразующих единиц – КОЕ) определяли методом предельных разведений (от 10^2 до 10^9) при высеве на плотные питательные среды (МПА).

Штамм *E.coli* 64Г выращивали на МПБ (pH 7.0-7.4), содержащей 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты. Штамм *E.coli* 64Г культивировали в течение 24 и 48 ч. Результаты роста исследуемых культур в питательных средах (МПБ) с

содержанием и без содержания соляной кислоты проводили через 24 и 48 ч. культивирования сред в термостате при 37°C.

Результаты изучения резистентности штамма *E.coli* 64Г к соляной кислоте по фотоколориметрическому методу свидетельствуют, что рост исследуемой культуры *E.coli* 64Г наблюдался в средах содержащих соляную кислоту в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, (при исследовании выросших штаммов через 24 ч.) и на средах содержащих соляную кислоту в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, (при исследовании выросших штаммов через 48 ч.). В контроле наблюдался рост всех культур на средах, не содержащих соляную кислоту.

Параллельно изучали устойчивость к соляной кислоте культуры *E.coli* 64Г по уровню накопления биомассы, изменению числа КОЕ методом предельных разведений (от 10^2 до 10^9) при высеве выросших культур (через 24 и 48 ч.) на плотные питательные среды (МПА).

Учет результатов опыта проводили после посева суспензии исследуемой культуры разных разведений на МПА, через 24 ч. культивирования его в термостате при 37°C. Затем проводился подсчет выросших колоний.

Результаты исследования показали, что при высеве 24-часовой суспензии штамм *E.coli* 64Г в разведении - 10^2 на МПА (определение живых клеток), выросших в МПБ с содержанием соляной кислоты в концентрациях 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1,0%, 1,2%, 1,5%, 1,8%, 2,0% и 2,5 % рост наблюдался штамма *E.coli* 64Г (от 78 до 89 колоний). Аналогичные результаты были получены при высеве 48-часовой суспензии исследуемых культур в тех же концентрациях. Рост выросших КОЕ штаммов эшерихий составлял в среднем от 55 до 64 колоний. Высевы со сред содержащих 1,8%, 2,0% и 2,5 % соляной кислоты не дали роста исследуемой культуры, независимо от экспозиции культивирования.

Выводы. Результаты исследования свидетельствуют, что штамм *E.coli* 64Г обладает набором свойств, позволяющих конкурировать с патогенными и условно патогенными микроорганизмами и удовлетворять следующим требованиям: является нормальным обитателем желудочно-кишечного тракта здоровых животных; непатогенный и нетоксичный; переносит пассаж через желудок (обладать определенным уровнем устойчивости к желчи и соляной кислоте).

Таким образом, проведенные исследования дают основание предполагать, что подход к разработке пробиотиков должен основываться на изучении многих параметров, включающих в первую очередь всестороннюю оценку свойств микроорганизмов – пробиотиков.

Список литературы

1 Смирнов В.В., Коваленко, Н.К., Подгорский, В.С., Сорокулов, И.Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов.// Микроб., вирусол., иммунол.- 2002. -Т. 64. - № 4.- С. 64-75.

2 Новик Г.И., Самарцев А.А. Биологическая активность микроорганизмов – пробиотиков //Прикладная биохимия и микробиология - 2006.- №2 – С. 39-42.

3 Данилиевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков.//Ветеринария. - 2005.- №11.- С.8-11.

4 Стегний Б.Т., Гужвинская, С.А. Перспективы использования пробиотиков в животноводстве. / Б.Т.Стегний// Ветеринария.-2005.-№ 5.-С. 10-12.

Бияшев К.Б., доктор ветеринарных наук, профессор,
e-mail: kadyr39@mail.ru

Нургожаева Г.М., кандидат ветеринарных наук,
e-mail: gulsin.nurgozhaeva@yandex.ru

Кошкимбаев С.С., магистр ветеринарных наук,
e-mail: seryk.koshkymbaev@gmail.com

Жуманов К.Т., PhD, e-mail: kairat_nur85@mail.ru

Тыницкая В.Ю., магистрант, e-mail: tyniskaya@gmail.com

Баймолда С.Р., магистрант, e-mail: sara1994b@mail.ru