

уровень дисперсии яиц *T. regenti* большой поганкой превысил показатели для других видов птиц – 7,83 экз. яиц/ос., что связано с попаданием в небольшую выборку по этому виду птиц одной самки, у которой в носовой полости было обнаружено 41 яйцо при обычном максимальном значении 3 яйца (т. е. у остальных особей этого вида данный показатель составляет 1,2 экз. яиц/ос.). У большого крохалея в летний период было найдено одно яйцо *T. regenti*. Осенних данных по указанным выше видам птиц нет.

**Заключение.** Проведенный анализ сезонной динамики дисперсии яиц шистосоматид различными видами дефинитивных хозяев показал, что в поддержании локальных очагов церкариоза птицы способны участвовать на протяжении всего года как в местах зимовок, о чем свидетельствуют данные, полученные во время весенней дисперсии и в период гнездования. При этом в распространении шистосоматидной инвазии участвуют как взрослые особи, так и появившиеся в сезон размножения (у одного из птенцов кряквы в возрасте 1 мес. зарегистрировано 106 яиц *B. polonica*). Постоянно высокий уровень дисперсии инвазионного материала водоплавающими птицами поддерживается за счет различий в сроках активного размножения у трематод *B. polonica* (июль), *T. regenti* (сентябрь) и висцеральных видов *Trichobilharzia* (апрель–май).

### Литература

1. Хейдорова Е. Э. // Экология и животный мир. Минск, 2012. № 1. С. 17–26.
2. Скрябин К. И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. М., 1928. С. 1–45.
3. Дубинина М. Н. Паразитологическое исследование птиц. Л., 1971. Вып. 4. – 139 с.
4. Bayssade-Dufour C. et al. // Parasite. 2006. Vol. 13. P. 205–214.
5. Dorst J. // Payot (Paris). 1956. – 419 p.
6. Stunkard H. W. // J. of Parasitol. 1959. Vol. 45. P. 389–394.
7. Combes C. // Comptes Rendus de l'Academie des Sciences (Paris). Serie D. 1967. Vol. 264. P. 1051–1052.
8. Barber K. E., Caira J. N. // J. of Parasitol. 1995. Vol. 81. P. 584–592.

E. E. KHEIDOROVA

### SEASONAL ASPECTS OF BREEDING OF BIRD SCHISTOSOMES AND A SHARE OF BIRDS IN DISPERSION OF INVASION MATERIAL

#### Summary

In this article the results of analysis of season dispersion of eggs of schistosomes *Bilharziella* and *Trichobilharzia* by wildfowl which was conducted on the base of data of the monitoring of many years (2005–2012) for invasion of wildfowl by Schistosomatidae trematodes in the northern and central parts of Belarus are given. It is established that swimming birds are able to take part in distribution of schistosome invasion throughout the year. In the article the differences in terms of active breeding of different trematode species are given consideration: *B. polonica* (July), *T. regenti* (September) and visceral species of *Trichobilharzia* (April–May).

УДК 636.087.7

Е. Ф. ЧЕРНЯВСКАЯ, А. Д. БАЕШКО, Н. А. БЕЛЯСОВА

### ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЦЫПЛЯТ

Белорусский государственный технологический университет, Минск

**Введение.** Перевод птицеводства на промышленные технологии содержания и кормления, ограничение контактов птицы с почвой, растениями и другими естественными факторами, а также широкая химизация отрасли и нерациональное применение антимикробных средств способствуют нарушению микробных экологических систем в пищеварительном тракте животных и возникновению дисбактериозов [1].

Распространению кишечных инфекций, прежде всего сальмонеллеза, на птицефабриках способствуют также сложная экологическая обстановка, экономическая нестабильность хозяйств,

несбалансированность питания (токсичность некоторых кормов и нередко наличие в них патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в том числе сальмонелл). Происходящие при этом нарушения процессов пищеварения наносят значительный экономический ущерб, связанный с прямыми потерями поголовья и снижением его продуктивности. Применение антибиотиков и других дезинфектантов в этих условиях малоэффективно и экологически небезвредно. Все вышеперечисленное обуславливает необходимость разработки экологически безвредных средств борьбы с источниками инфекции [2].

В настоящее время для борьбы с распространенными на птицефабриках Беларуси заболеваниями применяют антибиотикотерапию, имеющую ряд серьезных недостатков [3].

Альтернативой антибиотикотерапии в животноводстве является использование пробиотиков, основой которых служат выделенные из организма здоровых животных бактерии с комплексом ценных свойств. Применение пробиотиков не только обеспечивает лечение серьезных инфекционных заболеваний птицы, но и служит профилактической мерой.

К пробиотическим препаратам предъявляют следующие требования: непатогенность и нетоксичность; неинвазивность и неканцерогенность; антагонистическая активность по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), но не к микроорганизмам нормобиоты человека или животного; способность к адгезии на эпителии и приживлению в пищеварительном тракте [4]; штаммы, предназначенные для пробиотиков, должны быть устойчивы к желчи, фенолу, основным антибиотикам и быть способными достигать минимальной концентрации  $10^6$ – $10^8$  КОЕ/г содержимого кишечника [5]; наличие литической активности, антибиотикорезистентности, обусловленной хромосомальными детерминантами, локализованными не в составе мобильных элементов [6]. Среди многообразия микроорганизмов, заселяющих ЖКТ, именно молочнокислые бактерии характеризуются физиолого-биохимическими свойствами, наиболее полно соответствующими предъявляемым требованиям.

Результаты исследований и накопленный практический опыт доказали эффективность применения пробиотиков в промышленном птицеводстве. При их применении снижается число заболеваний ЖКТ, увеличивается сохранность птицы, темпы прироста ее живой массы. Немаловажны экологические аспекты применения пробиотиков: сокращаются объем и частота применения антимикробных препаратов, продукция не содержит антимикробных средств [7].

Кроме того, из литературных источников следует, что применение пробиотиков стимулирует клеточные факторы иммунитета путем активизации лейко- и эритропоэза у подопытных цыплят и окислительно-восстановительных процессов в их организме в пределах верхних границ физиологической нормы; под влиянием пробиотиков происходит повышение качественных и количественных показателей продукции – увеличивается убойный выход, а также улучшается аминокислотный (большее содержание незаменимых аминокислот) и жировой (увеличение процентного содержания ненасыщенных жирных кислот) состав куриного мяса, что улучшает его качество и питательную ценность [7].

Таким образом, применение пробиотических препаратов способствует нормализации процессов пищеварения, активизации обменных процессов, повышению естественной резистентности организма и его устойчивости к действию неблагоприятных факторов внешней среды, повышению интенсивности роста и продуктивности цыплят, а также увеличению яйценоскости кур, оплодотворяемости яиц и выводимости цыплят [8].

Разработка и производство пробиотиков – лечебно-профилактических препаратов и продуктов функционального питания – является одним из наиболее перспективных направлений биотехнологии.

Цель работы – выделение из помета цыплят молочнокислых бактерий, обладающих пробиотическим потенциалом и определение последовательностей ДНК, обеспечивающих участки гомологии, необходимые для создания интегрирующих векторов.

**Материалы и методы исследований.** В качестве объекта исследования выступали молочнокислые бактерии, выделенные из помета цыплят Смолевичской птицефабрики.

Получение чистых культур проводили с использованием общепринятых методов [9]. Инкубирование и хранение бактерий осуществляли на плотных и жидких средах М17 [10], питатель-

ном бульоне (ПБ) и питательном агаре (ПА) [11], в обезжиренном молоке [12] с использованием общепринятых методов [12]. Определение антагонистических свойств молочнокислых бактерий проводили с помощью усовершенствованного диффузионного метода [13]. Тест-бактериями во всех методах служили санитарно-показательные бактерии *Salmonella typhimurium* TA 100 и *Staphylococcus aureus* 25922.

Литическую активность, антибиотикорезистентность бактерий определяли с использованием общепринятых методов [14, 15].

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием набора реактивов PCR Master Mix (2x) и праймеров, подобранных к уникальной для представителей рода *Enterococcus*, но универсальной для представителей вида *E. faecalis* последовательности ДНК и стандартных праймеров для гена 16S РНК в программируемом термоциклере «Терцик».

Секвенирование ДНК проводили с использованием набора BigDye Terminator 3.1. Для каждого образца осуществляли амплификацию с праймерами к гену 16 S РНК, визуализировали с помощью электрофореза, выделяли из геля и проводили секвенирующую реакцию. Электрофорез проводили в ДНК-анализаторе ABI PRISM 310 с соответствующим программным обеспечением. Результаты анализировали с помощью программного пакета Sequencing Analysis v5.3.0. Анализ результатов сиквенса проводили с помощью программ BLAST [16] и Align X.

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли общепринятыми методами [17]. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле, в качестве маркера использовали Lambda DNA/HindIII Marker 2 (Fermentas).

**Результаты и их обсуждение.** Для выделения пробиотически ценных молочнокислых бактерий из помета цыплят использовали различные элективные условия: инкубирование посевов при 30 °С на питательном агаре (рН 7.0), при 30 и 42 °С на пептонно-дрожжевой среде M17 (рН 2.6 и 6.9) и в молоке при 42 °С (рН 6.5).

Среди 134 выделенных штаммов к молочнокислым бактериям на основании физиолого-биохимических признаков отнесены 50. У этих бактерий исследовали свойства, характеризующие пробиотические микроорганизмы.

Одним из наиболее значимых для представителей микробиоты ЖКТ цыплят свойством является способность расщеплять полимерные субстраты, присутствующие в избытке в составе кормов, на мономеры. По результатам анализа литических свойств установлено, что из 50 МКБ 28 (56 %) обладают выраженной протеолитической активностью, 5 (10 %) – амилалитической и только 1 штамм МКБ обладает и протеолитической и амилалитической активностью одновременно. Среди выделенных молочнокислых бактерий не выявлено изолятов, обладающих целлюлолитической активностью.

Важным свойством пробиотических бактерий является антибиотикорезистентность. На сегодняшний день на птицефабриках для профилактики и лечения бактериальных инфекций используют определенные схемы антибиотикотерапии, которые включают в себя применение таких препаратов, как линкомицин, энрофлоксацин, доксициклин, колистин, оксациллин, тилозин, тетрациклин и др.

На рис. 1 представлены результаты определения антибиотикорезистентности выделенных МКБ. Черным цветом на диаграмме отмечено процентное содержание МКБ, устойчивых к тем антибиотикам, которые на сегодняшний день используются на птицефабрике. Значительное относительное содержание МКБ, устойчивых к применяемым антибиотикам, свидетельствует о широком распространении резистентности к этим препаратам и, следовательно, об изначальной неэффективности применения подобной схемы антибиотикотерапии.

Как следует из рис. 1, выделенные МКБ характеризуются полирезистентностью, проявляя устойчивость минимум к 5 антибиотикам, среди которых присутствуют эритромицин и бензилпенициллин. При этом два последних антибиотика уже достаточно давно не применяют на птицефабриках.

Возможным объяснением выявленного обстоятельства служит то, что цыплята после вылупления быстро заселяют свой изначально стерильный ЖКТ путем склевывания помета взрослых птиц, который содержит микробиоту, устойчивую к антибиотикам, применявшимся ранее.

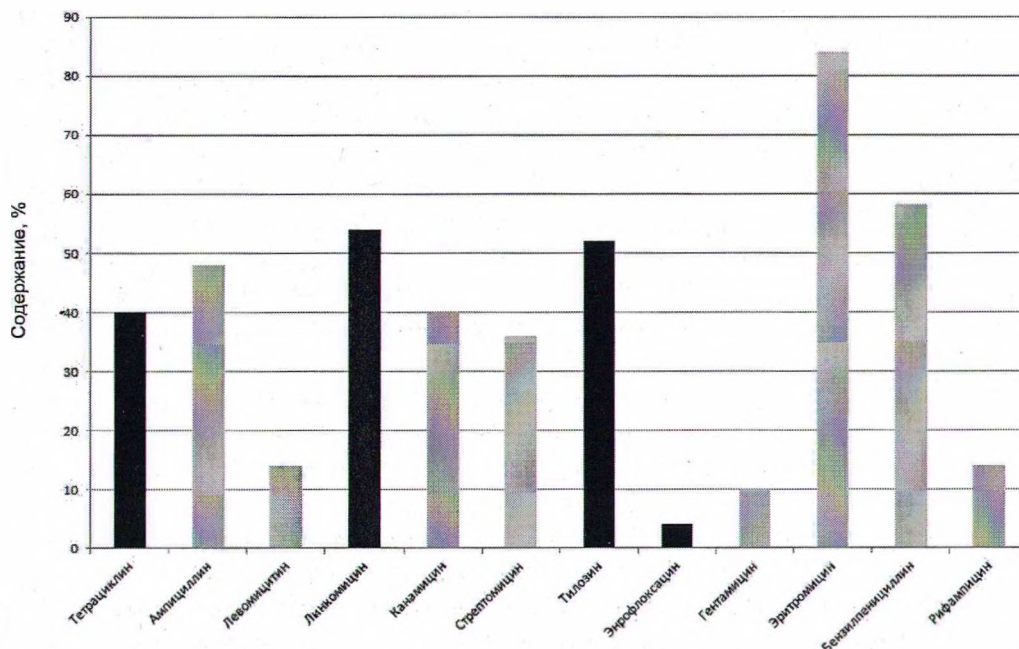


Рис. 1. Антибиотикорезистентность выделенных МКБ

Таким образом, устойчивость к антибиотикам сохраняется в популяциях кишечной микробиоты цыплят очень долго, даже после исключения антибиотика из программы терапии.

Одним из важнейших свойств пробиотических бактерий является их способность развиваться в условиях ЖКТ хозяина: устойчивость к низким значениям pH, содержанию в среде фенола и высокой концентрации NaCl.

Молочнокислые бактерии, являясь ацидофилами, легко переносят высокую кислотность ЖКТ птиц, а кроме того, значительный процент МКБ (84 %) устойчив к фенолу в концентрации 0,2 % и примерно половина отобранных штаммов (46 %) – к NaCl в концентрации 4 %, что свидетельствует об их способности сохранять жизнеспособность в ЖКТ кур.

Антагонистические свойства исследуемых бактерий определяли по отношению к санитарно-показательным бактериям *Salmonella typhimurium* TA 100 и *Staphylococcus aureus* 25922.

В ходе определения антагонистических свойств выделенных штаммов мы столкнулись с проблемой их слабой выраженности в условиях лабораторного эксперимента. Для регистрации даже незначительной антагонистической активности бактерий разработан новый метод, который позволил дополнительно выявить способность подавлять рост *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* у 10 штаммов МКБ (20 % от общего числа проанализированных штаммов) [13]. Антагонистические свойства этих бактерий не регистрировались традиционными методами.

В таблице представлены результаты выявления антагонистических свойств исследуемых молочнокислых бактерий.

#### Антагонистические свойства МКБ (50 штаммов)

Проявляют антагонизм по отношению к тест-бактериям			Не проявляют антагонистических свойств
<i>S. typhimurium</i> TA 100	<i>St. aureus</i> 25922	Одновременно к <i>S. typhimurium</i> TA 100 и <i>St. aureus</i> 25922	
4 (8 %)	4 (8 %)	29 (58 %)	13 (26 %)

Как видно из таблицы, значительное количество выделенных молочнокислых бактерий проявляют антагонистические свойства по отношению к санитарно-показательным тест-бактериям и поэтому могут служить основой для создания пробиотического препарата.

Антагонистические свойства бактерий мы рассматриваем как самые важные для пробиотических штаммов и поэтому при отборе пробиотически ценных изолятов ориентировались в основном на них.

По результатам проведенных исследований и анализа физиолого-биохимических свойств выделенных молочнокислых бактерий среди 50 штаммов отобраны два, которые отнесены к виду *Enterococcus faecalis* на основании анализа последовательностей гена 16S РНК. Оба штамма обладают антагонистической активностью по отношению к санитарно-показательным бактериям *Salmonella typhimurium* TA 100 и *Staphylococcus aureus* 25922, слабовыраженной протеолитической активностью, устойчивостью к антибиотикам, применяемым на птицефабриках. Антибиотикорезистентность сохраняется у выделенных бактерий при обработке акридиновыми красителями и инкубировании при повышенной температуре (42 °С), что указывает на хромосомную локализацию соответствующих детерминант. Кроме того, бактерии *Enterococcus faecalis* M42 42.1.3 способны развиваться в присутствии фенола (0,2 %) и значительной (4 %) концентрации NaCl.

В отобранных бактериях планируется клонировать ген куриного лейкоцитарного интерферона, экспрессия которого должна повысить противовирусный потенциал разрабатываемого пробиотического препарата. Векторы для клонирования, как известно, в качестве маркеров для отбора трансформантов чаще всего содержат гены устойчивости к антибиотикам, которые могут передаваться от пробиотических бактерий к патогенной микробиоте, обеспечивая ее антибиотикорезистентность. Более оправданным является использование в птицеводстве интернирующих векторов, поскольку в этом случае увеличивается стабильность наследования клонированных генов и снижается вероятность передачи генетического материала патогенным бактериям.

Все молочнокислые бактерии в той или иной мере проявляют протеолитическую активность, что обеспечивает им расщепление протеинов молока. Однако для пробиотических бактерий, наследующих ген лейкоцитарного интерферона, протеолитические свойства нежелательны, поскольку протеазы могут разрушать синтезируемый клетками интерферон.

Для создания интернирующего вектора нами подобран конститутивный для *Enterococcus faecalis* ген *htrA*, кодирующий сериновую протеазу широкого спектра действия [18]. Выбор гена, кодирующего протеазу, в качестве мишени для интеграции вектора обусловлен необходимостью снизить уровень и спектр протеолитической активности пробиотических бактерий, чтобы снизить вероятность гидролиза интерферона.

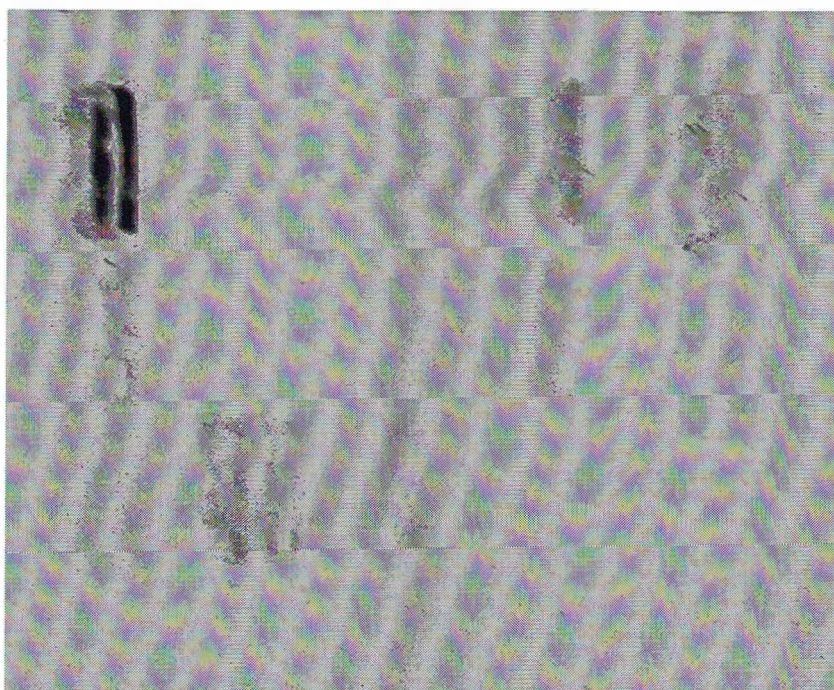


Рис. 2. Полученные в ходе ПЦР ампликоны (слева направо: 600 пар нуклеотидов, 706 пар нуклеотидов, маркер Lambda DNA/HindIII Marker 2)

Анализ пяти доступных в базе данных NCBI геномов *Enterococcus faecalis* показал, что все они содержат ген *htrA*, последовательности нуклеотидов которого практически идентичны (всего 10 замен на 1200 пар нуклеотидов), что позволило подобрать к этому гену две пары специфических праймеров (AATCACGGCGACACAAAAGTC – прямой, GGCAGCATCGGTTTGAATGG – обратный; TCCGGCAACAATGGTAACGA – прямой, CACGAACCACTACGCCAGTT – обратный), для амплификации участков в 600 и 706 пар нуклеотидов соответственно [19].

Амплификация ДНК бактерий с подобранными парами праймеров обеспечила получение ампликонов ожидаемого размера (рис. 2), наличие которых не только свидетельствует о возможности использования этого гена в качестве участка гомологии, но и подтверждает принадлежность выделенных штаммов к *Enterococcus faecalis*.

**Заключение.** Анализ физиолого-биохимических свойств выделенных молочнокислых бактерий позволил отобрать наиболее перспективные пробиотические штаммы, которые отнесены к виду *Enterococcus faecalis* на основании анализа последовательностей гена 16S РНК и амплификации фрагментов ДНК со специфическими праймерами. Бактерии этих штаммов содержат конститутивный ген *htrA*, отдельные участки которого амплифицированы для использования в качестве сайтов гомологии при создании интегрирующего вектора, содержащего ген куриного лейкоцитарного интерферона.

### Литература

1. Панин А. Н., Зинченко Е. В. Иммунобиотики в ветеринарной практике. Пушино, 2000. – 163 с.
2. Научное обоснование необходимости использования пробиотиков в птицеводческих хозяйствах [Электронный ресурс] / Клуб потребителей АРГО. – Режим доступа: <http://argonet.ru>. – Дата доступа: 25.08.2013.
3. Ноздрин Г. А., Иванова А. Б., Шевченко А. И., Ноздрин А. Г. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве. Новосибирск, 2005. – 224 с.
4. Кашиперова Т. А. и др. // Биотехнология (Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия). 2004. № 5. С. 39–48.
5. Marteau P., Rambaud J. C. // FEMS Microbiol. Rev. 1993. N 12. P. 207–220.
6. Бондаренко В. М. // Фарматека. 2005. № 20 (115). С. 46–54.
7. Обоснованность применения пробиотиков в промышленном птицеводстве [Электронный ресурс] // Webpticerpom. – Режим доступа: <http://www.webpticerpom.ru>. – Дата доступа: 27.08.2013.
8. Фармакологическая характеристика пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и эффективность их применения в птицеводстве: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.04. СПб., 2008. – 27 с.
9. Методы общей бактериологии: в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта и др. М., 1983. Т. 1. – 536 с.
10. Terzaghi B. E., Sandine W. E. // Appl. Microbiol. 1975. N 29. P. 807–813.
11. Белясова Н. А. Микробиология: лабораторный практикум. Минск, 2007. – 160 с.
12. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. М., 2005. – 608 с.
13. Чернявская Е. Ф., Дутко А. А., Белясова Н. А. // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 1. С. 73–77.
14. Методы общей бактериологии: в 3 т. / под ред. Ф. Герхардта и др. М., 1983. Т. 2. – 468 с.
15. Семина Н. А. и др. // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2004. № 4. С. 306–359.
16. Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс] / BLAST. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. – Дата доступа: 16.08.2012.
17. Sambrook J., Russell D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York, 2001. – 2344 p.
18. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс] / NCBI Genome. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. – Дата доступа: 07.04.2013.
19. Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс] / BLAST. – Режим доступа: [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). – Дата доступа: 18.05.2013.

E. CHERNYAVSKAYA, A. BAESHKO, N. BELYASOVA

### PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM GASTROINTESTINAL TRACT OF CHICKENS

#### Summary

Physiological and biochemical properties of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal (GI) tract of chickens were identified and analyzed, their probiotic potential was evaluated. According to the results of the analysis of the two selected strains of bacteria *Enterococcus faecalis*, DNA sequences that provide regions of homology required to create integrative vectors were identified.