

УДК 636.087.7

Е. Ф. Чернявская, аспирант (БГТУ);
Н. А. Белясова, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ);
В. А. Прокулевич, доктор биологических наук, профессор (БГУ)

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИ ЦЕННЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЖКТ ЦЫПЛЯТ

На основании проведенных исследований определены и проанализированы физиолого-биохимические свойства пробиотически ценных молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) цыплят. Выделенные бактерии проверяли на соответствие их свойств требованиям, предъявляемым к пробиотическим препаратам. По результатам проведенного анализа отобраны штаммы молочнокислых бактерий с наибольшим пробиотическим потенциалом.

On the basis of the conducted researches physiological and biochemical properties probiotic valuable lactic bacteria allocated from a gastrointestinal path of chickens are defined and analysed. The allocated bacteria checked on compliance of their properties to the demands made to probiotic preparations. By results of the carried-out analysis strains of lactic bacteria with the greatest probiotic potential are selected.

Введение. В настоящее время на многих птицефабриках Беларуси и постсоветского пространства распространены опасные инфекционные заболевания, для борьбы с которыми широко применяется антибиотикотерапия, имеющая ряд серьезных недостатков [1].

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

Таким образом, одним из наиболее перспективных направлений биотехнологии является разработка и производство пробиотиков – лечебно-профилактических препаратов и продуктов функционального питания, оказывающих позитивное влияние на здоровье человека и животных.

К пробиотическим препаратам предъявляют ряд требований: непатогенность и нетоксичность; наличие антагонистических свойств по отношению к основным условно-патогенным штаммам бактерий микробиоты ЖКТ, которые могут быть связаны как с образованием молочной кислоты в ходе сбраживания лактозы молочнокислыми бактериями, так и с выделением бактериоцинов; наличие литической активности, антибиотикорезистентности, обусловленной хромосомальными детерминантами, локализованными не в составе мобильных элементов; способность к закреплению, выживанию и размножению в ЖКТ [2].

Молочнокислые бактерии еще со времен работ И. И. Мечникова заслужили репутацию самых востребованных пробиотиков, отличающихся комплексом полезных свойств: хорошей

адгезией к клеткам ворсинок кишечника, способностью продуцировать антимикробные агенты (разнообразные бактериоцины, молочную кислоту), стимуляцией иммунного ответа хозяина. В настоящее время получены и используются на практике пробиотические молочнокислые бактерии широкого спектра видов, преимущественно представители родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*. Они находят применение как в профилактике, так и при лечении дисбактериозов, а также гастроэнтеритов человека и животных. В то же время исследования по выделению и совершенствованию новых пробиотических бактерий не прекращаются [3, 4]. Это, с одной стороны, обусловлено возросшей популярностью пробиотиков на фоне проблем, вызванных широкомасштабным использованием антибиотиков в сельском хозяйстве и стремительным накоплением полирезистентных к антибиотикам форм бактерий: в отличие от антибиотиков, пробиотики обеспечивают заместительную терапию и профилактику заболеваний, конкурируя в желудочно-кишечном тракте с патогенной микробиотой. С другой стороны, стало известно, что имеет место специфичность в адгезии определенных бактерий к поверхности клеток ворсинок кишечника определенного хозяина, что обуславливает необходимость поиска наиболее эффективно колонизирующих слизистую ЖКТ того или иного хозяина бактерий.

Основная часть. Поскольку целью представленного исследования являлось выделение молочнокислых бактерий (МКБ) из помета цыплят и последующий отбор наиболее перспективных пробиотических штаммов на основе соответствия их физиолого-биохимических свойств требованиям, предъявляемым к пробиотическим препаратам, у выделенных бактерий проверяли

наличие ряда признаков: антагонистических свойств к санитарно-показательным бактериям, литической активности, антибиотикорезистентности и способности развиваться в условиях, близких к условиям ЖКТ кур.

В качестве объекта исследования выступали молочнокислые бактерии, выделенные из помета цыплят Смолевичской птицефабрики, предмета – их физиолого-биохимические свойства.

Для выделения пробиотически ценных молочнокислых бактерий осуществлено инкубирование проб помета в различных селективных условиях (рис. 1).

Среди 134 выделенных штаммов к молочнокислым бактериям отнесены 50 штаммов. Они проверены на соответствие их физиолого-биохимических свойств требованиям, предъявляемым к пробиотическим бактериям.

Наличие литической активности позволит пробиотическим бактериям принимать участие в расщеплении макромолекул на мономеры, тем самым повышая доступность этих веществ организму-хозяину.

Определение литической активности осуществляли с помощью общеупотребимых методов [5]. По результатам определения литической активности установлено, что 28 из 50 МКБ обладают протеолитической активностью (56%), 5 – амилολитической (10%), и только лишь 1 штамм МКБ обладает и протеолитической и амилολитической активностями. Молочнокислых бактерий, обладающих целлюлолитической активностью, не выявлено.

Важным свойством анализируемых молочнокислых бактерий является антибиоти-

корезистентность. 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, оксипиллин, тилозин, тетрациклин и др. Наличие у пробиотических МКБ устойчивости к названным антибиотикам позволит им развиваться в ЖКТ кур на фоне антибиотикотерапии.

Антибиотикорезистентность определяли диск-диффузионным методом [6]. На рис. 2 представлены полученные результаты. Черным цветом на диаграмме отмечено процентное содержание МКБ, устойчивых к тем антибиотикам, которые на сегодняшний день используются на птицефабрике, иначе говоря, данные бактерии будут сохранять жизнеспособность при обработке птиц отмеченными препаратами.

С другой стороны, 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. Исключение составляет лишь энрофлоксацин (только 4% устойчивых бактерий), который стали применять на птицефабрике недавно. Следует иметь в виду, что МКБ более чувствительны к различным химическим агентам, в том числе антибиотикам, чем прочие представители микробиоты ЖКТ.

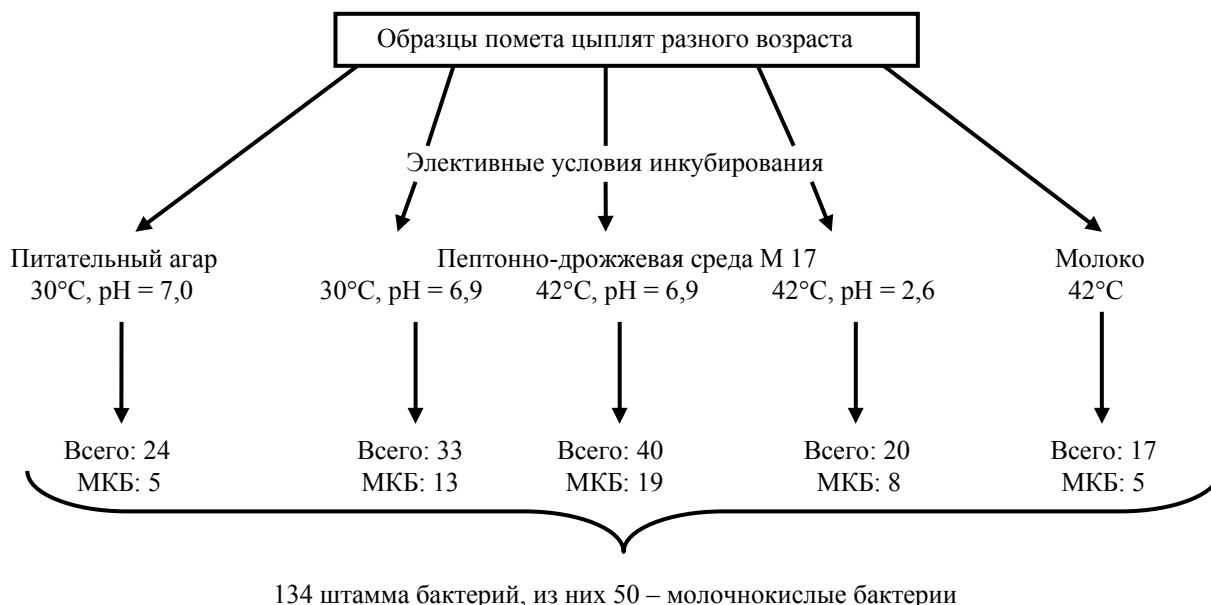


Рис. 1. Элективные условия инкубирования, использованные для выделения различных типов бактерий из помета цыплят

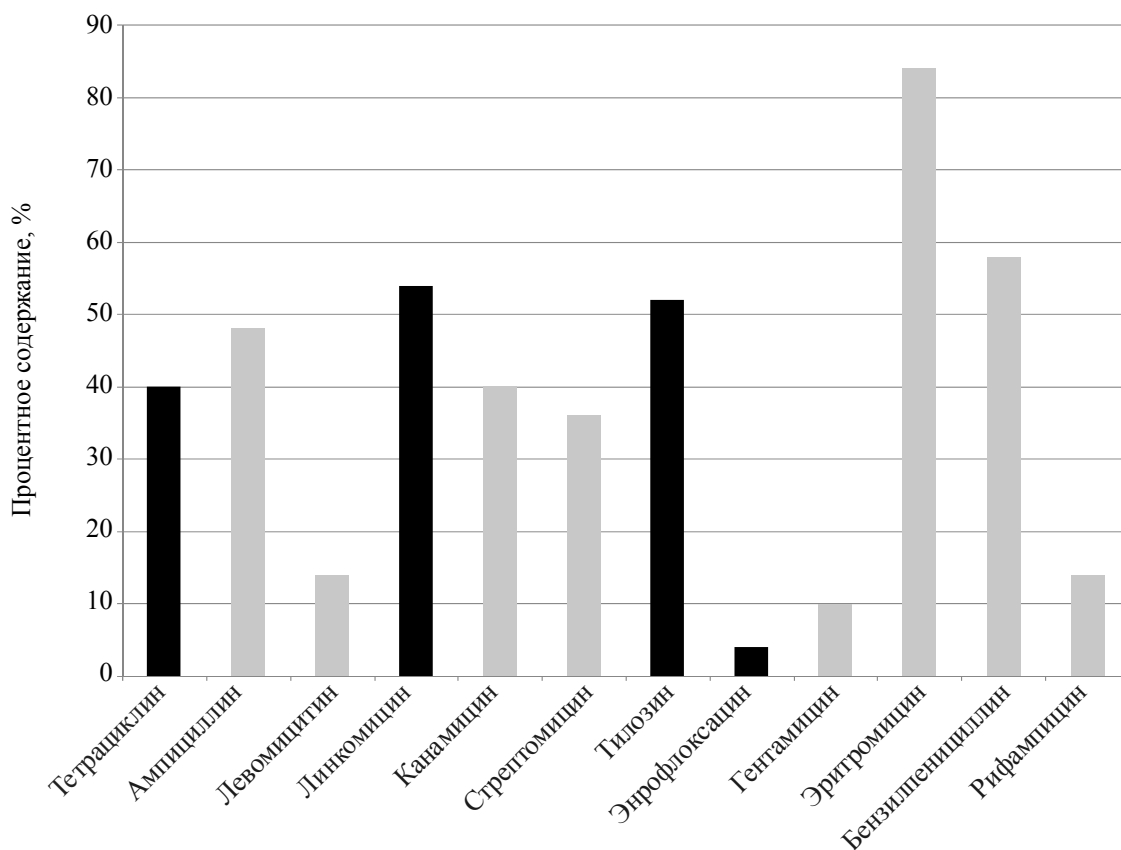


Рис. 2. Антибиотикорезистентность выделенных МКБ

Помимо этого, как видно из диаграммы, выделенные МКБ характеризуются устойчивостью минимум к 5 антибиотикам, среди которых присутствуют эритромицин и бензилпенициллин. При этом два последних антибиотика уже достаточно давно не применяют на птицефабриках.

Возможным объяснением этого обстоятельства служит то, что цыплята после вылупления быстро заселяют свой изначально стерильный ЖКТ путем склеивания помета взрослых птиц, который содержит микробиоту, устойчивую к антибиотикам, применявшимся ранее. 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 acidофилами, легко переносят высокую кислотность ЖКТ птиц. Данные по способности бактерий развиваться в присутствии фенола и NaCl представлены в табл. 1.

Как видно, значительная часть молочнокислых бактерий проявляет устойчивость к содержанию фенола и NaCl в среде, что свидетельствует

о том, что они хорошо переносят условия обитания в ЖКТ цыплят и кур.

Таблица 1

Устойчивость бактерий к фенолу и NaCl

Общее количество штаммов, сквашивающих молоко	Устойчивых к 0,2%-му фенолу	Устойчивых к 4%-му NaCl
50	42 (84%)	23 (46%)

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

В ходе определения антагонистических свойств исследуемых штаммов мы столкнулись с проблемой слабой выраженности этих свойств. Для регистрации даже незначительной антагонистической активности разработан новый метод определения антагонистических свойств, который позволил дополнительно выявить антагонизм у 10 штаммов МКБ (20% от общего числа проанализированных штаммов), антагонистические свойства которых не регистрировались традиционными методами. Метод основан на применении стерильных микропористых мембран. На поверхность мембран наносили суспензии

бактерий антагонистов и инкубировали посе-
вы. После удаления мембран на газоне тест-
бактерий обнаруживали зоны ингибирования
роста (рис. 3).

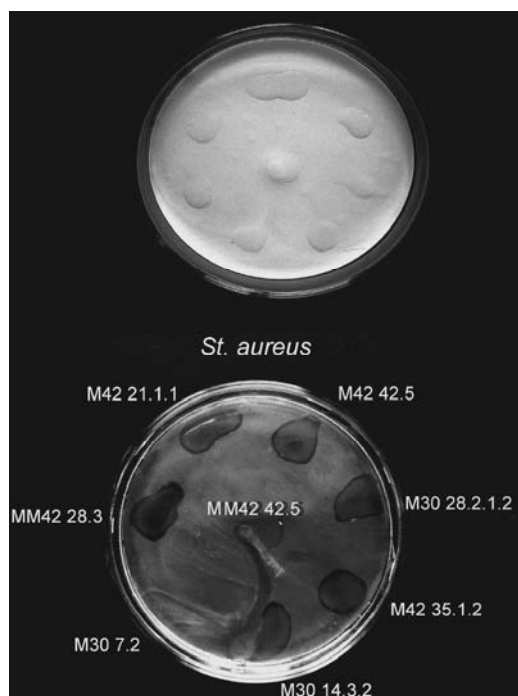


Рис. 3. Антагонистические свойства
молочнокислых бактерий по отношению
к тест-культуре *St. aureus* 25922
в разработанном методе:
сверху – аликвоты культуральной жидкости
антагонистов на поверхности бактериального фильтра;
снизу – зоны ингибирования роста тест-бактерий

В табл. 2 представлены результаты опреде-
ления антагонистических свойств исследуемых
молочнокислых бактерий.

Таблица 2
Антагонистические свойства МКБ

Общее количе- ство штаммов, сбраживающих молоко	Проявляют антагонизм по отношению к тест-бактериям		
	<i>S. typhi- murium</i> ТА 100	<i>St.</i> <i>aureus</i> 25922	<i>S. typhimurium</i> ТА 100 + <i>St.</i> <i>aureus</i> 25922
50	33 (66%)	33 (66%)	29 (58%)

Как видно из табл. 2, значительное количе-
ство молочнокислых бактерий проявляют анта-
гонистические свойства по отношению к сани-

тарно-показательным тест-бактериям и поэто-
му могут служить основой для создания проби-
отического препарата.

Антагонистические свойства бактерий мы
рассматриваем как самое важное свойство про-
биотических штаммов и поэтому при отборе
пробиотически ценных штаммов ориентирова-
лись в основном на них.

Заключение. По результатам проведенных
исследований и анализа физиолого-биохими-
ческих свойств выделенных молочнокислых
бактерий среди 50 штаммов отобраны два, кото-
рые отнесены к роду *Enterococcus* на основании
анализа последовательностей гена 16S РНК. Оба
штамма обладают антагонистической активнос-
тью по отношению к санитарно-показательным
бактериям *Salmonella typhimurium* ТА 100 и *Sta-
phylococcus aureus* 25922, протеолитической
активностью, устойчивы к антибиотикам,
применяемым на птицефабриках. Кроме того,
E. Faecalis способен развиваться в присутствии
фенола и значительной концентрации NaCl.

Литература

1. Научные основы применения пробиоти-
ков в птицеводстве: монография / Г. А. Нозд-
рин [и др.]. – Новосибирск: Новосиб. гос. аграр.
ун-т, 2005. – 224 с.
2. Бондаренко, В. М. Поликомпонентные
пробиотики: механизм действия и терапевти-
ческий эффект при дисбиозах кишечника /
В. М. Бондаренко // Фарматека. – 2005. – № 20
(115). – С. 46–54.
3. Fuller, R. Probiotics in man and animals /
R. Fuller // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – Vol. 66. –
P. 365–378
4. Dessalegn, A. Evaluation of the probiotic
properties and antibiotic resistance of lactic acid
bacteria isolated from awaze, qotchqotca and tef
dough, traditional Ethiopian fermented foods /
A. Dessalegn, M. Ashenafi // Internet J. of Food
Safety. – 2010. – Vol. 12. – P. 187–191.
5. Методы общей бактериологии в 3 т. / под
ред. Ф. Герхардта [и др.] – М.: Мир, 1983. –
Т. 1. – 536 с.
6. Определение чувствительности микроор-
ганизмов к антибактериальным препаратам:
МУК 4.2.1890004 / Н. А. Семина [и др.] // Кли-
н. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2004. – № 4. –
С. 306–359.

Поступила 28.02.2013