
ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ПРОБИОТИКОВ

УДК 636.5:579.64:612.33

**КРИТЕРИИ ОТБОРА ШТАММОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ
ДЛЯ ПТИЦ**

Бовкун Г.Ф.

Брянская государственная сельскохозяйственная академия, Россия

Кишечная бифидофлора обеспечивает нормобиоз и жизнеспособность молодняка кур (Тимошко, 1990). Недостаточное количество или исчезновение бифидобактерий вызывает развитие дисбиотических изменений у птиц, которые широко распространены и могут иметь как функциональный характер, так и быть деструктивными, осложненными токсикозом и септициемией.

Сведения о видовом составе бифидофлоры, циркулирующей у птиц, имеют важное значение и необходимы для создания эффективных пробиотиков. По данным Сорокина (1973), Mitsuoka (1988), Тимошко (1990) в кишечнике цыплят доминируют *B. thermophilum* var *avium* и *B. pseudolongum* var *avium*. Есть сообщение Джановой (1995), что в состав бифидофлоры входят и такие виды как *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, что вызывает сомнения. Современные зарубежные исследователи Ventura et al. (2003) отмечают преобладание таких видов как *B. pullorum*, *B. animalis*, *B. gallinarum*.

Большинство культур бифидобактерий, выделенных из организма, характеризуются неустойчивостью при культивировании и выдерживают не более трех пересевов (Новик, 1998), поэтому в состав бифидосодержащих пробиотических препаратов, предназначенных для животных, входят стабильные штаммы, используемые для приготовления пробиотиков медицинского назначения или диетических кисломолочных продуктов. Отбор индигенных для птиц штаммов бифидобактерий, имеющих стабильную кинетику роста, выраженные адгезивные свойства, антагонистическую активность, резистентность к противомикробным препаратам – важное условие разработки перспективных пробиотиков лечебно-профилактического действия при заболеваниях органов пищеварения у молодняка и взрослых кур.

Целью работы было изучение фенотипических свойств и молекулярно-генетических особенностей выделенного от цыпленка штамма бифидобактерий, имеющего стабильную кинетику роста для последующей разработки перспективных препаратов пробиотического действия.

Штамм бифидобактерий, используемый в данной работе, был выделен из содержимого слепых отростков от клинически здорового цыпленка 100-дневного возраста кросса Хайсекс-браун в условиях ОАО Снежка Брянской области. Штамм поддерживали в лиофилизированном состоянии, а для культивирования использовали полужидкую кукурузно-лактозную среду (КЛС). Первичная идентификация штамма заключалась в изучении его фенотипической характеристики (морфологических, культуральных, биохимических свойств). Биохимическую активность оп-

ределяли посевом на углеводные субстраты: арабинозу, ксилозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, крахмал, маннит, сорбит, дульцит.

У изучаемого штамма определяли способность свертывать молоко, расти при 46,5⁰С после выдерживания при 70⁰С в течение 30 мин. Для молекулярно-генетических исследований использовали биомассу бифидобактерий третьей и четвертой генераций. Хромосомная ДНК была выделена по методике Ventura et al. (2003), последовательность праймеров для ПЦР также подбирали по методике этого же автора. Продукты амплификации анализировали методом электрофоретического разделения. Анализ треков проводили визуально, сравнивая показатели изучаемого штамма с 6 видами бифидобактерий: *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. species*.

Продуцирование полисахаридсвязывающих белков (лектинов) исследовали с помощью изоэлектрофокусирования компонентов с молекулярной массой более 30 кД из концентратов культуральной жидкости в пластине полиакриламидного геля в градиенте рН 4-8, последующего блотинга, обработки блотов биотинилированными полисахаридами, стрептавидин-пероксидазой и хемилюминесцентного анализа связанной с блотом пероксидазы в режиме живого изображения в камере BioChem (UVP, США).

Адгезивные свойства биомассы бифидобактерий изучали в пробирочной реакции гемагглютинации (РГА) с 3%-ной взвесью свежих эритроцитов петуха и коровы по методике, описанной в работе Бондаренко и соавт. (1987). Степень адгезивной активности бифидобактерий изучали по методике Брилис и соавт. (1989), подсчитывая в одном поле зрения количество бифидобактерий, прикрепленных к 50 эритроцитам, и определяли средний показатель адгезии (СПА).

Антагонистическую активность определяли методом смешанных культур после 24-, 48-, 72-часового совместного культивирования изучаемого штамма и 18 культур, из которых 8 составляли *Pseudomonas aeruginosa*, 2 – *Proteus vulgaris*, 2 – *Salmonella enteritidis*, 1 – *S. infantis*, 5 – патогенные эшерихии. Результаты учитывали по наличию роста, подсчитывали количество колоний, определяли микробное число или регистрировали отсутствие роста.

Чувствительность изучаемого штамма к противомикробным препаратам – тилану, гентамицину, хлорамфениколу, окситетрациклину и энрофлоксацину изучали методом серийных разведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Штамм, используемый в данной работе, представлял собой крупные грам-положительные палочки, расположенные группами и цепочками, в которых особи сцеплены между собой. Клетки некоторых культур, имеющих положительную кинетику роста и ацидогенеза, образовывали крупные гранулы в виде широких полос. После 2-х и 7-дневного хранения при рН питательной среды 5,0, а также после 3-месячного хранения при рН 6,8 в составе популяций появлялись крупные кокковидные формы. Испытуемый штамм имел высокую активность роста на КЛС, его накопление в культурах третьей – девятой генераций после оживления из лиофилизированного состояния после 16-часового культивирования составляло 11,3 lg КОЕ/г при незначительных колебаниях. Культивирование сопровождалось динамикой снижения рН, максимальное накопление бифидобактерий соответствовало наивысшему ацидогенезу при рН 3,8-4,7. Культуры третьей и четвертой генераций по-

сле оживления из лиофилизированного состояния имели наибольший прирост биомассы – 93,7-90%.

Рост в виде изолированных колоний, имеющих грушевидную форму, иногда округлую, наблюдали после посева разведения 10^{-5} лиофилизированной культуры и разведений 10^{-9} , 10^{-10} культур, выращенных на КИС. Результаты определения ферментативной активности изучаемого штамма, а также способности к росту при высоких температурах представлены в табл. 1.

Таблица 1. Биологические свойства изучаемого штамма

Тесты	Наименование углеводных субстратов										Молоко 46,5°C 24 часа 70°C 30 мин
	Арабиноза	Глюкоза	Сахароза	Мальтоза	Галактоза	Раффиноза	Рамноза	Маннит	Сорбит	Дульцит	
Рост	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	Сверт - -
pH	4,6	4,2	4,35	4,15	4,6	5,2	5,8	6,8	6,8	6,8	- - -

Изучаемый штамм имел активный рост и расщеплял арабинозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, слабо раффинозу, рамнозу, не расщеплял маннит, сорбит, дульцит, свертывал молоко. Перечисленные признаки сахаролитической активности свойственны бифидобактериям, однако провести видовую идентификацию, используя перечисленные тесты, было невозможно. Отсутствие роста при культивировании в условиях повышенной температуры (46,5°C) и после выдерживания культуры при 70°C, исключали принадлежность изучаемого штамма к виду *B. thermophilum*.

Значительный прогресс в систематике бифидобактерий, как отмечала Блохина и др. (1995), был достигнут после внедрения методов молекулярной биологии (определения нуклеотидного состава ДНК, гибридизации ДНК-ДНК, изучения последовательности рибосомных РНК), позволяющих провести идентификацию разных видов бифидобактерий. Поэтому в последние годы были открыты новые виды бифидобактерий: *B. gallinarum*, *B. seaculare*, *B. ruminantum*, уточнена видовая принадлежность еще 20 видов.

При сравнении электрофоретического профиля продуктов расщепления хромосомной ДНК изучаемого штамма и шести видов идентифицированных бифидобактерий были выявлены как гомологичные, так и специфические полосы электрофореграммы, которые были аналогичными электрофореграмме вида *B. gallinarum*, представленной в работе Ventura et al. (2003). Такой подход идентификации и дифференциации бифидобактерий описан Блохиной и др. (1995).

В соответствии с морфологическими, культуральными, некоторыми биологическими свойствами и видоспецифическими «генетическими отпечатками», изучаемый штамм бифидобактерий был идентифицирован как *Bifidobacterium gallinarum*. Он обладал лектиновой активностью. Секретируемые с поверхности бифидобактерий лектины связывали фосфорилированный маннан, их обнаруживали в пе-

риод наибольшего накопления биомассы. Лектины изучаемого штамма отличались от лектинов других видов бифидобактерий в интервале pH 4-8. Если принять во внимание данные Adlerbeth et al. (1996) о том, что адгезия пробиотических бактерий в кишечнике теплокровных может включать в себя взаимодействие лектинов поверхности бактерий с остатками маннозы в муциновом слое, то можно предположить их участие в адгезии изучаемого штамма. Продуцирование лектинов у лактобактерий и бифидобактерий установлено Лахтиным, Попеловой (2004). Авторы характеризуют лектины как природные гликопротеиды, связывающиеся с мишенями и обеспечивающие адгезию индигенной микрофлоры кишечника к эпителиоцитам с последующим формированием биопленки. С помощью лектинов происходит взаимодействие бифидофлоры с В-лимфоцитами, макрофагами; в результате запускаются механизмы иммуномодуляции, митогенеза клеток-мишеней, системы комплемента.

Адгезивную активность, обеспечивающую колонизирующую способность индигенной микрофлоры, считают ведущим тестом в селекции штаммов-продуцентов пробиотиков. При изучении адгезивных свойств штамма *B. gallinarum* на моделях свежих эритроцитов петуха и коровы была установлена его способность преимущественного узнавания эритроцитов петуха.

Таблица 2. Адгезивная активность штамма МС-42 в присутствии свежих эритроцитов петуха и коровы

Показатели	Эритроциты петуха	Эритроциты коровы
Количество бифидобактерий, прикрепленных к 50 эритроцитам, М±м	273±2,6	28,4±1,03
Средний показатель адгезии (СПА) М±м	5,46±0,13	0,46±0,04

Количество бифидобактерий, прикрепленных к эритроцитам петуха, составляло 273±2,6, СПА был равен 5,46±0,13, который можно характеризовать как высокий. *B. gallinarum* прикреплялись и к эритроцитам коровы, но изучаемый штамм можно было характеризовать как не адгезивный, так как среднее количество бифидобактерий, прикрепленных к 50 эритроцитам, составляло 28,4±1,03, СПА – 0,46±0,03.

Одним из важных критериев перспективности штаммов бифидобактерий является оценка их антагонистической активности, которая осуществляется, в основном, *in vitro*, методом смешанных культур, после 24-, 48-, 72-часового совместного культивирования.

Штамм *B. gallinarum* оказывал бактерицидное действие на 6 из 8 культур *Ps. aeruginosa*, так как роста в разведениях 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} из смешанных культур не обнаруживали. Семь культур *Ps. aeruginosa* были выделены из комбикормов, воздуха птицепомещения, крови погибших цыплят и кур; одна культура *Ps. aeruginosa* №159 с выраженными токсигенными свойствами, была взята из музея.

Действие штамма *B. gallinarum* на две культуры *Ps. aeruginosa*, выделенные из крови погибших цыплят, мы характеризовали как бактериостатическое, так как *Ps. aeruginosa* №3-92 выделяли в количестве 4,7 lg КОЕ /мл, культуру №1-84 – в количестве 3,17 lg КОЕ /мл. В контроле при посеве разведений 10^{-7} , 10^{-8} отмечали сплошной рост. Таким образом, количество синегнойной палочки уменьшалось в

1000 или в 10000 раз. Бактериостатическое действие бифидобактерий оказывало влияние на культуральные свойства синегнойной палочки; выделенные после совместного культивирования популяции формировали изолированные колонии со слабым пигментообразованием, что свидетельствовало о потере подвижности.

Таблица 3. Антагонистическая активность штамма *B. gallinarum* после 72-часового культивирования

N/N	Наименование культур, источник выделения	Наличие роста в разведениях, lg КОЕ /мл					
		совместное культивирование				контроль	
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 1-95, комбикорм	-	-	-	-	+	+
2.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 3-95, комбикорм	-	-	-	-	+	+
3.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 8-95, комбикорм	-	-	-	-	+	+
4.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 6-84, труп курицы	-	-	-	-	+	+
5.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 11-92, воздух	-	-	-	-	+	+
6.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 3-92 труп цыпленка	2,36	3,23	4,7	-	+	+
7.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 1-84, труп цыпленка	2,46	3,17	-	-	+	+
8.	<i>Ps. aeruginosa</i> № 159, музейный	-	-	-	-	+	+
9.	<i>Proteus vulgaris</i> №4, кишечник	-	-	-	-	+	+
10.	<i>Proteus vulgaris</i> №3, кишечник	-	-	-	-	+	+
11.	<i>S. enteritidis</i> №7-98, комбикорм	-	-	-	-	7,9	8,3
12.	<i>S. enteritidis</i> №5-98, комбикорм	-	-	-	-	8,04	8,9
13.	<i>S. infantis</i> , комбикорм	-	-	-	-	7,84	8,47
14.	<i>E. coli</i> №5-00, труп цыпленка	-	-	-	-	8,07	8,77
15.	<i>E. coli</i> №1-00, труп цыпленка	-	-	-	-	8,25	8,84
16.	<i>E. coli</i> №7-00, труп цыпленка	-	-	-	-	8,04	8,41
17.	<i>E. coli</i> , лактозонегативная, кишечник	-	-	-	-	8,14	8,9
18.	<i>E. coli</i> , лактозонегативная, кишечник	-	-	-	-	8,14	8,47

Штамм *B. gallinarum* оказывал бактерицидное действие на культуры *Proteus vulgaris*, выделенные из содержимого слепых отростков цыплят при дисбиотических нарушениях. Посевы разведений из смешанных культур не содержали протеев, тогда как в контроле отмечали их сплошной рост. Изучаемый штамм оказывал бактерицидное действие на сальмонеллы серовариантов: *S. enteritidis*, *S. infantis*, выделенных из комбикормов, тогда как в контроле отмечали активный рост сальмонелл от 7,84 до 8,9 lg КОЕ /мл. Штамм *B. gallinarum* подавлял рост эшерихий, среди которых были возбудители эшерихиоза, а также лактозонегативные, способ-

ствующие развитию функционального и деструктивного дисбактериоза. Посевы смешанных культур не содержали кишечных палочек, а в контроле количество кишечных палочек соответствовало активному росту (7,84-8,9 lg КОЕ /мл).

В условиях промышленного птицеводства широко используют для профилактики и лечения болезней органов пищеварения препараты на основе тилана и энрофлоксацина. Поэтому мы изучали чувствительность штамма *B. gallinarum* к тилану, гентамицину, хлорамфениколу, окситетрациклину, энрофлоксацину методом серийных разведений в кукурузно-лактозной среде с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Изучаемый штамм был устойчивым к тилану, МИК больше 125 мкг/мл. МИК гентамицина, хлорамфеникола, окситетрациклина и химиотерапевтического препарата энрофлоксацин составляла более 500 мкг/мл.

Таблица 4. Спектр и концентрация противомикробных препаратов, чувствительность штамма *B. gallinarum*

Наименование препарата	Наличие роста при концентрации (мкг/мл)								
	500	250	125	62,5	31,25	15,6	7,8	3,9	1,95
Тилан	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Гентамицин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Хлорамфеникол	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Окситетрациклин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Энрофлоксацин	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Полученные данные свидетельствуют об антибиотикорезистентности штамма *B. gallinarum* и устойчивости к самому современному, эффективному противомикробному препарату – энрофлоксацину.

Идентификации с последующим изучением биологических свойств подлежат стабильные при культивировании штаммы бифидобактерий. При первичной идентификации бифидобактерий типичными морфологическими свойствами следует считать их палочковидную форму, крупные размеры, положительное окрашивание по Граму и фактор когезии, выраженный сцеплением клеток с образованием разветвленного рисунка и цепочек, а также коккоподобные формы, расположенные цепочками. Сведения о сахаролитической активности в отношении некоторых углеводных субстратов не могут быть критерием родовой и видовой оценки выделенных культур. Репликационный анализ хромосомной ДНК позволяет получить видоспецифические генетические отпечатки, что делает возможным распознавание разных видов бифидобактерий.

В состав бифидофлоры цыплят современных кроссов входит *Bifidobacterium gallinarum*. Нельзя исключить возможность участия лектинов, секретируемых изучаемым штаммом, в бактерицидном действии в отношении бактерий, содержащих на своей поверхности маннан или олигоманнозидные гликаны.

Адгезивная активность, обеспечивающая колонизирующую способность индигенной микрофлоры, у изучаемого штамма *B. gallinarum* имеет зоологическую специфичность и индифферентна в отношении эритроцитов млекопитающих.

Обобщая результаты бактерицидного действия изучаемого штамма на 100% культуры протей, кишечной палочки, сальмонелл, на 87,5% культур *Ps. aeruginosa* и бактериостатическое действие на 12,5% культур *Ps. aeruginosa*, его можно харак-

теризовать как штамм с высокой антагонистической активностью, что также позволяет ему успешно колонизировать кишечник. Устойчивость штамма к основным противомикробным препаратам, используемым для подавления возбудителей и условно-патогенных бактерий при желудочно-кишечных заболеваниях молодняка, подтверждает эффективность его применения в составе пробиотических препаратов, а также для использования в режиме сочетанной антимикробной и пробиотической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блохина И.П., Леванова Г.Ф., Лихачева А.Ю. Подходы к классификации бифидобактерий на основе данных о структуре их ДНК. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 1995, 4: 22-29.
2. Брилис В.И., Брилине Т.А., Левков Л.А. Методические возможности изучения адгезии в колонизирующей способности микроорганизмов. В кн: Теоретические и практические проблемы гнотобиологии. М.: Агропромиздат, 1989: 206-212.
3. Бондаренко В.М. Гемагглютинирующая и адгезивная способность штаммов клебсиелл и энтеробактерий. Журнал микробиол., 1987, 7: 3-6.
4. Джанова З.Ф. Сочетанное применение пробиотика бифидумбактерина и иммуномодулятора тималина для профилактики колибактериоза у цыплят. Автореф. дисс... канд. вет. наук. С.-Петербург. Академия ветеринарной медицины. СПб., 1995, 19 с.
5. Лахтин В.М., Поспелова В.В., Лахтин М.В. Лектины, адгезины и лектиноподобные белки лактобацилл и бифидобактерий. В сб.: Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспектива: материалы конференции. М., 2004: 7-8.
6. Новик Г.И. Сохранение жизнеспособности и физиологических свойств бифидобактерий при криоконсервировании и лиофилизации. Микробиология, 1998, 67(5): 631-636.
7. Сорокин В.В., Тимошко М.А., Николаев А.В. Нормальная микрофлора кишечника животных. Кишинев: Штиница, 1973, 178 с.
8. Тимошко М.А. Микрофлора пищеварительного тракта молодняка сельскохозяйственных животных. Кишинев: Штиница, 1990, 315 с.
9. Adlerbeth I., Ahne S., Johansson M. A man-specific adherence mechanism in *L. plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 2244-2251.
10. Mitsuoka T., Sera T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. Bifid. Microflora, 1988, 3: 11-28.
11. Ventura M., Meylan V., Zink R. V. Molecular microbiological analysis of Bifidobacterium isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal restriction analysis. Appl. Environ. Microbiol., 2003, 69(7): 4296 – 4301.

Criteria for selection of bifidobacterium strains in obtaining probiotics for poultry

Bovkun G.F.

Bryansk State Agricultural Academy, Bryansk, Russia

A new strain of bifidobacteriums isolated from cecum appendixes of 100-d chick was identified as *B. gallinarum* on the base of morphologic, cultural treats and specific genetic fingerprints. The high adhesive activity of the strain was demonstrated to erythrocytes of rooster, and low activity - to erythrocytes of cow. A new strain of *B. gallinarum* showed antagonistic activity to *Ps. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, inhibited growth of *E. coli*, esherichii and lactose negative bacteria. The strain has resistance to action of gentamicin, oxytetracyclin, tylan, chloramphenicol, enrophloxacin. The data obtained suggest that a new strain of *B. gallinarum* may be used in complex probiotic preparations and in combined bactericidal and probiotical therapy.

Key words: Bifidobacteriums, B. gallinarum, adhesive activity, antagonistic activity, probiotics, poultry

Prob. Prod. Anim. Biol., 2007, 2:131-138