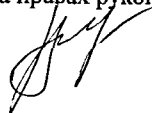


На правах рукописи



Позднякова Ирина Геннадьевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ШТАММОВ
BACILLUS CEREUS, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ
ПРЕПАРАТА С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

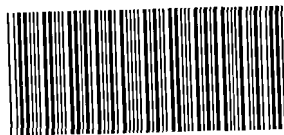
03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

28 НОЯ 2013



005540462

Саратов 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник
Назарова Лариса Степановна

доктор биологических наук, доцент
Каблучева Татьяна Ивановна

Официальные оппоненты:

Васильев Дмитрий Аркадьевич
доктор биологических наук,
профессор, ФГБОУ ВПО
«Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия
им. П.А. Столыпина», заведующий
кафедрой микробиологии, вирусологии,
эпизоотологии и ветеринарно -
санитарной экспертизы

Микеров Анатолий Николаевич
кандидат биологических наук,
ГБОУ ВПО «Саратовский
государственный медицинский
университет им. Н.И. Разумовского»,
доцент кафедры общей гигиены и
экологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Санкт – Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Защита диссертации состоится «19» мая 2013 г. в 9⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.04 на базе ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» по адресу: 410005, Саратов, ул. Соколова, 335.

Автореферат диссертации разослан «16» мая 2013 г.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл. 1, ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», учёному секретарю диссертационного совета.

Учёный секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Стремительно развивающаяся устойчивость патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам настоятельно диктует необходимость поиска иных подходов к воздействию на них. С конца 20-го столетия вновь стали использовать методы борьбы с инфекцией, постулированные Л. Пастером, И. И. Мечниковым и их современниками, которые базируются на антагонизме одних видов микроорганизмов по отношению к другим. Этот постулат явился основой для создания пробиотиков. Такими микробами - антагонистами, используемыми в качестве пробиотиков, являются: лактобактерии, бифидобактерии, энтерококки, кишечная палочка, бациллы. Пробиотики на основе бацилл, по мнению ряда исследователей, предпочтительнее, поскольку они относятся к аллохтонной микрофлоре и в кишечнике приживаться не будут (Бондаренко, 2006; Денисов, 2009 и др.).

Спорообразующие бактерии, как известно, способны оказывать антагонистическое действие на другие микроорганизмы, выделяя в среду первичные и вторичные метаболиты, а также конкурируя с ними за питательные вещества (Стайниер, Эльберг, 1979; Урдачи и др., 2008). Кроме того, при разрушении спор в среду также поступают вещества с антимикробной активностью (Никитенко и др., 2000). Антимикробное действие бацилл может быть направлено только на грамположительные или грамотрицательные бактерии и грибы, или продуцируемые ими субстанции могут подавлять рост многих видов микроорганизмов (Сорокулова, 1979). Использование смеси различных штаммов бацилл в ветеринарии для обработки помещений, где содержатся сельскохозяйственные животные (торговая марка «Экофренд»), или поверхностей тела здоровых животных (разработка Бельгийской компании CHRISAL) основано на конкуренции между бациллами и условно-патогенными микроорганизмами за питательные вещества (Probiotica in Progress-PiB). При этом размножение последних подавляется (Смирнов, 1993).

Имеются фармакопейные препараты, созданные на основе бацилл различных видов, эффективные против кокковой микрофлоры, грамотрицательных бактерий, микобактерий, актиномицетов, кандид, грибов, поражающих растения, а также насекомых, клещей, нематод (Кукси, 1976; Забокрицкий, 2006; Лукьянцев, 2010).

Степень разработанности проблемы. В медицинской и ветеринарной практике применяют целый ряд препаратов, приготовленных на основе бацилл разного вида: «Биосептин», «Биоспорин», «Гнеспорин», «Бактисубтил», «Ветом 1.1.» и другие.

В обзоре В. Д. Похиленко и В. В. Перелыгина (2007) приводятся сведения о российских и зарубежных препаратах на основе спорообразующих бактерий, из которого следует, что их достаточно много, но только в единичных зарубежных биопрепаратах, предназначенных в качестве пробиотиков для людей, действующим началом служит *B. cereus* - «Бактисубтил». В доступной литературе нет сведений о возможности использовать одни и те же

пробиотические штаммы *B. cereus* и как средство для санации ран, и как пробиотики, и для обработки клеток с мелкими непродуктивными животными. Поэтому постоянно ведётся поиск новых штаммов бацилл, в том числе *B. cereus*-продуцентов биологически активных веществ для использования в качестве главных составляющих лечебных препаратов, используемых как пробиотики при инфекционных заболеваниях различной этиологии, а также для профилактики нагноительных процессов (Михайлова, Гринько, 2010).

Цель работы: разработка экспериментального биопрепарата с пробиотическими свойствами на основе апатогенных штаммов *Bacillus cereus*, их апробации на животных в сравнении с официальными препаратами.

Задачи исследования:

1. Обосновать поиск во внешней среде (из микробиоценоза ветеринарного госпиталя) апатогенных штаммов *B. cereus* с антагонистической активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам и выделить их в чистую культуру.

2. Изучить спектр антимикробного действия выделенных штаммов *B. cereus* и отобрать среди них штаммы с выраженной антагонистической активностью.

3. Исследовать основные биологические свойства 3-х отобранных штаммов *B. cereus*: морфологические, культуральные, биохимические, температурную устойчивость, чувствительность к антибиотикам.

4. Разработать критерии отбора штаммов *B. cereus*-антагонистов условно-патогенных микроорганизмов.

5. Сконструировать экспериментальный препарат с пробиотическими свойствами на основе штаммов *Bacillus cereus* и апробировать его в сравнительных экспериментах *in vitro* и *in vivo* с официальными пробиотиками.

Научная новизна работы. Выделены из объектов внешней среды и отобраны 3 апатогенных штамма *Bacillus cereus* 42, 45, 46, обладающие выраженной прямой и опосредованной антимикробной активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам *in vitro* и *in vivo*, исследованы их биологические свойства. Изучен спектр их антимикробного действия. Экспериментальный препарат созданный из смеси этих штаммов, названный «Бакцер», при наружном использовании санировал раны у экспериментальных и сельскохозяйственных животных более эффективно, чем культура, выделенная из официального препарата «Бактисубтил». «Бакцер» проявил себя и в качестве пробиотика, стимулируя развитие полезной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят из неблагополучного по колибактериозу хозяйства. Эффективность «Бакцер» была сопоставима с пробиотиком «Ветом 1.1.»).

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработаны критерии отбора штаммов *B. cereus* в качестве кандидатов для создания препаратов с пробиотическими свойствами.

Получение экспериментального препарата «Бакцер» открывает перспективы для его использования в качестве ранозаживляющего средства, пробиотика и средства для обработки клеток с мелкими непродуктивными животными, пребывающими в стационаре по поводу оперативных вмешательств.

По материалам диссертационной работы написаны «Методические рекомендации по выделению клинических изолятов бацилл и методам определения их безвредности и пробиотических свойств» (в соавторстве с Л.С. Назаровой, 2011), которые размещены на сайте научной библиотеки ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», предназначенные для специалистов в области биотехнологии и микробиологии. Акт о практическом использовании. Получен патент № 2435864 «Способ пробиотической обработки клеток с содержащимися в них мелкими непродуктивными животными в условиях ветеринарного госпиталя».

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами факультета ветеринарной медицины и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова».

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам антимикробного действия бацилл и их использования для создания лекарственных препаратов. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы.

При проведении исследования и изложения материала автором были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделены из внешней среды – госпитального микробиоценоза и отобраны 3 штамма *B. cereus* 42, 45, 46 с выраженной антимикробной активностью по отношению к грамположительным и особенно грамотрицательным условно патогенным микроорганизмам.

2. Чистые культуры выделенных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 имели фенотипические признаки, присущие данному виду, но не обладали факторами патогенности при тестировании *in vitro* и *in vivo*.

3. Сформулированы критерии отбора штаммов *B. cereus*, перспективных для создания препаратов с пробиотическими свойствами.

4. Экспериментальный биопрепарат, приготовленный из смеси 3-х отобранных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46, обладал санирующим и ранозаживляющим эффектом при наружном применении и свойствами

пробиотика при пероральном, сравнимыми с официальными препаратами на основе бацилл.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии, селекции животных» (Саратов, 2010); V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения» (Саратов, 2010); Научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной ветеринарии, посвященной 65-летию ветеринарной науки Кубани» (Краснодар, 2011); Международной научно-практической конференции, посвященной Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача, «Ветеринарная медицина 21 века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2011); конференции, посвященной 80-летию доктора ветеринарных наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Демкина Г. П. «Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии и селекции животных» (Саратов, 2011).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 12 работ из них 4 статьи - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 1 патент.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; собственных исследований, объекты, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение; а также заключения; выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 112 страницах, содержит 9 таблиц, 1 рисунок. Список литературы включает 203 источника, в том числе 93 зарубежных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты, материалы и методы исследований

Объекты исследования: 242 штамма микроорганизмов, из них 133 штамма, выделенные из ветеринарного госпиталя, в том числе 29 штаммов бацилл, 6 штаммов из ран экспериментальных животных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratiasp*, 2 штамма *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus* sp.); 40 штаммов из ран сельскохозяйственных животных (родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, семейства *Enterobacteriaceae*), 12 штаммов из музея кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии: *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca* 317, *Proteus vulgaris* 3503, пигментобразующие и необразующие штаммы *Pseudomonas aeruginosa* 1677, 128, 381, 35, 11, *Escherichia coli* 3495, *Candida albicans* 5152, *Bacillus cereus* 8035; 1 штамм, выращенный из пробиотика «Бактисубтил»; 50 штаммов бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров: молочнокислые, бифидобактерии, лактатферментирующие, бактерии группы *E. coli*, стрептококки, целлюлозолитические.

Животные: беспородные белые мыши обоего пола массой 18-20 г - 110 особей. Все эксперименты, в том числе умерщвление животных, проводили в соответствии с требованиями Федерального Закона от 01.01.1997г «О защите животных от жестокого обращения в процессе проведения опытов» и «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (2003); 3 козлёнка массой 5 кг, 11 поросят по 17 кг, коза 4 - х лет, цыплята-бройлеры кросса «Росс-308» - 300 голов.

Материалы. Питательные среды: мясопептонный агар и бульон, среда АГВ, среда Эндо, полужидкие среды Гисса с маннитом, лактозой, сахарозой, глюкозой и мальтозой, полужидкий мясопептонный агар, 5% кровяной агар, солевой агар с полимиксином, среда Сабуро, среда Кларка, цитратный агар Симмонса, мясопептонная желатина (МПЖ), среда Квасникова, Кистнера, Эугонара, Хамлина. Пластины биохимические, дифференцирующие энтеробактерии и стафилококки, кроличья сыворотка для определения коагулазы, системы индикаторные бумажные (СИБ) для определения оксидазы, ферментации глюкозы, наличия индола и сероводорода, диски с антибиотиками. Полипропиленовые фильтры с диаметром пор 0,45мм, стерильные фильтры (25мм QD/x), шприцевой фильтр, предназначенный для фильтрования труднофильтруемых образцов с размерами пор 0,2 мкм.

Реактивы и препараты: набор красок для окраски по Граму, Цилко, стандарт мутности - 0,5 по Мак-Фарланду (раствор BaCl_2 0,048 моль/л и раствор H_2SO_4 0,18 моль/л), 3% раствор перекиси водорода, 0,85 % раствор NaCl , раствор метилового красного, 20% раствор KOH , 5% раствор α -нафтола в абсолютном спирте, 40% KOH , 10% раствор формалина, 50% раствор глицерина для хранения культуры, спирты возрастающей концентрации, ксилол, парафин, растворы гематоксилина и эозина, фармакопейные препараты «Бактисубтил», «Циклоспорин Гексал», «Ветом 1.1.».

Методы. Исследование микрофлоры воздуха и различных поверхностей в помещениях госпиталя для животных проводили согласно методикам (Лабинская, Волина, 2008). Культуральные, морфологические, тинкториальные и биохимические свойства микроорганизмов, чувствительность к антибиотикам определяли по общепринятым методам (Лабинская, Волина; 2008 г; Приказ № 535 от 22 апреля 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», МУ 2002; МУК 4.2.1890-04). Биохимические свойства изолятов стафилококков и бактерий семейства *Enterobacteriaceae* исследовали также с помощью пластин биохимических и СИБ. Наличие в цитоплазме клеток бацилл жировых включений и белка изучали (Нетрусов, 2005). Определение принадлежности выделенных бацилл к виду *B. cereus* осуществляли согласно Межгосударственному стандарту («Метод определения *B. cereus*» ГОСТ 10444.8-88.). Факторы вирулентности (лецитиназная, протеолитическая, гемолитическая активности) определяли (Лабинская, Волина, 2008). Антагонизм штаммов *B. cereus* по отношению к микроорганизмам других

видов проводили методом агаровых блоков (Теппер и др., 2007). Определение отсроченного антагонизма бактерий по отношению к другим видам бактерий осуществляли по методу А.М. Пушкарёва (2007). Изучение выделения антимикробных веществ в питательную среду проводили по методу (Лазовская и др., 2008). Выделенные штаммы *B.cereus* сохраняли (Миллер, 1976). Для проверки действия температурного фактора на *B.cereus* 42, 45, 46, их содержали на скошенном агаре при 39-40 °С в течение 1 месяца без пересевов.

Безопасность штаммов *B. cereus in vivo* проверяли согласно указанию о методах введения препаратов, предназначенных для местного применения (на кожу и внутривнутрино), дополнив пероральным введением, как это рекомендуется для пробиотических штаммов. Аналогичный эксперимент проводили с обработкой животных иммуносупрессором «Циклоспорин Гексал» в терапевтических дозах (Добрица и др., 2001), т.к. рекомендуется иметь сведения о последствиях применения спорообразующих штаммов бактерий у особей с иммунодефицитами (Похиленко, Перельгин 2007).

Для создания биопрепарата на основе отобранных штаммов *B.cereus* 42, 45, 46, их выращивали в течение 5-ти суток на мясо-пептонном агаре, делали смыв стерильным физиологическим раствором и смешивали равные объемы.

Моделирование кожных ран проводили иссечением в межлопаточной области кожного лоскута. После их инфицирования осуществляли обработку биопрепаратом в дозах $3 \cdot 10^3$ м.к./мл, $3 \cdot 10^4$ м.к./мл или физиологическим раствором. Отделяемое из ран исследовали бактериоскопически и бактериологически, определяли чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам, измеряли размеры ран. Животных с инфицированными ранами кожи живота помещали на опилки, обработанные экспериментальным препаратом или стерильным физиологическим раствором.

Гистологически исследовали внутренние органы и биоптаты из ран лабораторных животных (Волкова, Елецкий, 1971).

Для опыта на цыплятах-бройлерах было сформировано по принципу аналогов 3 группы цыплят по 100 голов в каждой. У животных всех групп исследовали общее количество микроорганизмов в зобе и толстом кишечнике, а также уровень среди них молочнокислых, лактатферментирующих, целлюлозолитических микроорганизмов, бифидобактерий, стрептококков, бактерий группы *E. coli*. Подсчет общего количества микроорганизмов проводили по Бриду. Титр целлюлозолитических микроорганизмов определяли методом последовательных разведений от 10^{-4} до 10^{-6} (Каблучеева, 2000).

Статистическую обработку результатов экспериментальных исследований на мышах осуществляли по И.П. Ашмарину и А.А. Воробьеву [1962], в отдельных опытах-с помощью непараметрических методов исследования - Критерия У Вилкоксона – Манна -Уитни [Гублер, Генкин, 1973]. Статистическую обработку данных, полученных на цыплятах, проводили по В.С. Асатиани, а также методом вариационной статистики (Ойвин И.А.,

1960) с применением компьютера по программе Excel-7.0 из пакета Microsoft office - 2000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск и отбор штаммов *B. cereus* с антимикробной активностью

При бактериологическом исследовании микробиоценоза ветеринарного госпиталя в динамике на протяжении 1 месяца: микрофлоры воздуха в различных помещениях и поверхностей (операционные столы, столы для манипуляций, стены, клетки, где пребывали животные после оперативных вмешательств), было выделено 133 культуры микроорганизмов. Установлено, что среди них доминировали грамположительные кокки и бациллы: 84 штамма стафилококков различных видов, микрококков и 29 штаммов бацилл. Среди стафилококков встречались метициллинустойчивые штаммы, которые обнаружены только в воздушной среде, в частности *S. aureus* 8. В значительно меньшем количестве (36 штаммов) выделены грамотрицательные палочковидные бактерии (*E. coli*), и микроорганизмы родов *Branhamella* и *Acinetobacter*. Кроме этого, обнаружены плесневые и дрожжеподобные грибы (всего 10 штаммов). Последние были представлены *Candida albicans*. Из 29 штаммов бацилл, 21 не вызывал гемолиз эритроцитов при культивировании на кровяном агаре. Штаммы бацилл, выделенные с поверхностей клеток, гемолизинами не обладали, а у животных, после операции помещенных в эти клетки, нагноение в ранах отсутствовало. Вследствие этого были отобраны штаммы бацилл из клеток, изучена их принадлежность к виду *B. cereus*. Из 21 штамма бацилл 11 принадлежали к *B. cereus*, у 7 из которых определена способность к выработке антимикробных веществ. Из этих штаммов отобраны 3 с более высокой антимикробной активностью - *B. cereus* 42, 45, 46, у которых изучено дополнительно наличие таких факторов, как протеаза и лецитиназа, а также повреждающее действие на макроорганизм при различных путях их введения. Все 3 штамма не обладали факторами вирулентности и не вызывали гибели белых мышей.

Фенотипические признаки исходных и модифицированных *Bacillus cereus* 42, 45, 46

Чистые культуры исходных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46, которые культивировали общепринятым методом на мясо-пептонном агаре, образовывали колонии в R-форме. На мясо-пептонном бульоне все они росли в виде пленки. На дне пробирки образовывался хлопьевидный осадок. На желточно-солевом агаре с полимиксином отмечены восковидные колонии с изрезанными краями, но без радужного венчика. При окраске по Граму выявлены грамположительные палочки, расположенные хаотично или в виде цепочки (в зависимости от штамма). В мазках из суточной культуры, выращенной на среде с глюкозой и окрашенных фуксином, обнаружены внутри клеток зёрна волютина. При окраске конго красным в клетках бацилл белков, которые типичны для *B. thuringensis*, не обнаружено, но имелись капли жира при окраске суданом III, что характерно для *B. cereus*. Споры располагались в

центре и не превышали размеры клеток. Отмечена активная подвижность всех штаммов бацилл. Бациллы были каталазоположительные, ферментировали глюкозу, мальтозу, сахарозу до кислоты, маннит не ферментировали. Росли на цитратной среде Симмонса. Реакция с метиловым красным была отрицательной. Все штаммы образовывали ацетилметилкарбинол при постановке реакции Фогеса-Проскауера в модификации Баритта. Штаммы *B. cereus* 42, 45, 46 были чувствительны к гентамицину и офлоксацину.

При изучении морфологических, культуральных, биохимических признаков и чувствительности к антибиотикам у штаммов *B. cereus* 42, 45, 46, которые хранились при повышенной температуре установлено, что морфологические признаки бацилл всех штаммов изменились в сторону полиморфизма и расположения в мазке. Имела место диссоциация R-форм колоний в M-формы. Биохимическая активность штаммов не изменилась. Следовательно, имела место модификационная изменчивость штаммов. Интересным был факт появления чувствительности к большему набору антибиотиков, которые не действовали на исходные штаммы: левомецитину, цефалотину, цефазолину (Таблица 1). Впоследствии при хранении в условиях холодильника (+4 °С) фенотипические признаки бацилл восстановились, а повышенная чувствительность к антибиотикам сохранялась.

Культура *B. cereus*, выращенная из препарата «Бактисубтил» (штамм IP 5832), по ряду признаков отличалась от выделенных штаммов: на среде с полимиксином рост был очень скудный в виде округлых восковидных колоний с изрезанными краями белого цвета без венчика; на цитратной среде Симмонса культура рост не давала; чувствительность к антибиотикам была значительно выше, чем у госпитальных изолятов (Таблица 1).

Таблица 1 – Чувствительность к антибиотикам исходных и модифицированных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 и культуры из «Бактисубтил»

Антибиотики	Зоны отсутствия роста, мм (M ± m)						Культура из препарата «Бактисубтил»
	Штамм 42		Штамм 45		Штамм 46		
	Исходный	Модифицированный	Исходный	Модифицированный	Исходный	Модифицированный	
Левомецитин	–	25±1	–	18±1	23±3	28±2	26±3
Цефалотин	–	23±0	–	22±1	–	27±3	29±3
Цефазолин	–	15±1	–	24±2	–	21±1	23±2
Гентамицин	32±1	35±2	30±1	30±3	20±2	30±3	36±2
Офлоксацин	30±2	38±1	35±2	27±2	30±2	40±3	40±1

Примечание – «–» отсутствие чувствительности.

Антимикробная активность штаммов *Bacillus cereus* 42, 45, 46 по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Внутривидовой антагонизм бацилл

Установлено, что штаммы *B. cereus* 42, 45, 46 обладали способностью выделять в питательную среду бактерицидные вещества, действующие на все взятые в опыт бактерии. У выделенных и музейных культур стафилококков (*S. aureus* 209P, *S. aureus* 23, 36, 38, 41), в том числе метициллинустойчивого *S. aureus* 8 зоны отсутствия роста составили в среднем 20 ± 3 мм.

По отношению к *E. coli* антимикробная активность была больше выражена у штамма *B. cereus* 42, который более значительно подавлял рост всех взятых в опыт штаммов: *E. coli* 3495, *E. coli* 44, 47, 88. Зоны отсутствия роста составили в среднем 30 ± 5 мм. Самая значительная бактерицидная активность всех штаммов *B. cereus*, особенно *B. cereus* 45, отмечена по отношению к синегнойной палочке (*P. aeruginosa* 381), которая, будучи посеяна газоном, выросла в виде небольших островков.

Кроме того, эти микроорганизмы утрачивали способность выделять пигмент в питательную среду, а у музейного штамма *P. vulgaris* 3503 бациллы подавляли рост. При этом он рос в виде отдельных колоний. То есть у последних двух видов бактерий были подавлены факторы вирулентности. Таким образом, можно констатировать, что спектр антимикробной активности штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 широкий, хотя преобладал эффект, направленный против грамотрицательных бактерий.

Культура, выращенная из препарата «Бактисубтил», не выделяла при своем росте бактерицидные субстанции.

Модифицированные повышенной температурой штаммы *B. cereus* 42, 45, 46 практически утрачивали способность выделять в среду бактерицидные вещества, сохраняя ее в значительно редуцированном виде только к штамму *E. coli* 3495. Вокруг дисков, смоченных безмикробным фильтратом питательной среды, где выращивали бациллы, диаметр зон отсутствия роста составил в среднем 10 ± 1 мм.

Вместе с тем автоклавированный бульон, в котором выращивали эти штаммы бацилл при добавлении к питательной среде условно патогенных бактерий, стимулировал повышение их чувствительности к антибиотикам, а у синегнойной палочки дополнительно подавлялось выделение пигмента. Для примера приводим данные об антибиотико-чувствительности бактерий, выращенных с автоклавированным бульоном, где предварительно выращивали культуру из штамма *B. cereus* 45 (Таблица 2).

Как видно из таблицы 2, у штамма *S. aureus* 209 P выросла чувствительность к цефотаксиму и незначительно повысилась к другим препаратам, у штамма *E. coli* 3495 чувствительность изменилась мало, зато синегнойная палочка приобрела чувствительность ко всем препаратам, за исключением цефазолина.

Таблица 2 – Чувствительность условно-патогенных бактерий к антибиотикам после инкубации с автоклавированным бульоном, где выращивали *B. cereus* 45

Культуры	Зоны отсутствия роста в мм				
	Левоми- цетин	Гентами- цин	Офлок- сацин	Цефазо- лин	Цефо- таксим
<i>S. aureus</i> 209 P (контроль)	28±1	28±2	35±3	28±2	20±4
<i>S. aureus</i> 209 P (опыт)	30±3	30±4	38±3	28±2	35±4
<i>E. coli</i> 3495 (контроль)	25±3	28±2	30±5	27±5	30±2
<i>E. coli</i> 3495 (опыт)	25±2	30±5	35±2	30±3	15±2
<i>P. aeruginosa</i> 381(контроль)	–	–	25±2	–	–
<i>P. aeruginosa</i> 381 (опыт)	10±2	25±3	25±2	–	17±3

Примечание – «–» отсутствие чувствительности.

Штаммы *B. cereus*, 42, 45, 46, подвергнутые действию температурного фактора, взамен выделения бактерицидных веществ в питательную среду приобрели выраженную способность за счет роения подавлять рост тех же тестируемых условно-патогенных бактерий. На грамотрицательные бактерии (*E. coli* 3495 и особенно *P. aeruginosa* 381, 128, и 11) в большей мере действовал штамм *B. cereus* 46. Штаммы бацилл, особенно *B. cereus* 45, активно вытесняли *Candida albicans* 5152. Культура, выращенная из препарата «Бактисубтил», не превосходила по своей способности подавлять рост этих же штаммов бактерий и дрожжеподобных грибов, за исключением несколько более выраженного действия на *E. coli* 3495 и *K. oxytoca* 317 (Таблица 3).

После выращивания в течение 5 суток штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 на полипропиленовых дисках, наложенных на питательную среду (исследование отсроченного антагонизма), установлено, что на такой среде культуры условно-патогенных бактерий роста не давали, очевидно, из-за потребления питательных веществ бациллами.

Результаты этого опыта позволили заключить, что выраженность и прямого, и опосредованного антагонизма у изученных штаммов бацилл различна по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, поэтому было решено создать экспериментальный препарат из смеси 3-х штаммов *B. cereus* для практического использования («Бакцер»). Вместе с тем было важным определить, как они поведут себя при совместном культивировании *in vitro*, т.е. определить у них наличие внутривидового антагонизма. Для этих целей суточную культуру каждого штамма *B. cereus* 42, 45 или 46 заседали

газоном, после чего накладывали блоки агара с 5-ти суточной культурой этих же штаммов.

Таблица 3 – Прямой антагонизм штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 и культуры из препарата «Бактисубтил» по отношению к музейным штаммам условно-патогенных микроорганизмов

Штаммы условно-патогенных микроорганизмов	Диаметр зон расселения культур из <i>B. cereus</i> за пределы агарового блока, мм ($M \pm m$)			
	Штамм 42	Штамм 45	Штамм 46	Штамм из препарата «Бактисубтил»
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	40±1	35±2	23±2	не выселялся
<i>Escherichia coli</i> 3495	20±1	15±2	25±2	35±1
<i>Klebsiella oxytoca</i> 317	17±1	25±1	25±2	30±1
<i>Proteus vulgaris</i> 3503	15±2	18±2	18±2	15±1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11	35±1	35±2	не выселялся	не выселялся
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 381	30±1	30±2	40±2	30±1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 128	30±2	30±2	40±4	35±1
<i>Candida albicans</i> 5152	35±4	45±4	40±2	35±2

Установлено, что штаммы *B. cereus* 42, 45, 46 прямо действовали на рост друг друга, особенно активным был *B. cereus* 46, который подавлял подвижность не только у двух других культур (*B. cereus* 42 и 45), но и у клеток суточной культуры собственного штамма. Следовательно, можно было ожидать, что в ранах или при пероральном введении они, будучи внесены в смеси друг с другом, проявят внутривидовой антагонизм. В ходе дальнейшей работы данное предположение подтвердилось.

Микробиологическое и гистологическое изучение безопасности композиции экспериментального препарата «Бакцер» при различных путях поступления в организм белых мышей

У контрольных групп мышей, обработанных водой перорально или физиологическим раствором внутрибрюшинно, гистологические изменения во внутренних органах отсутствовали. Иммунодепрессант «Циклоспорин Гексал» оказывал в терапевтических дозах токсическое действие на организм

экспериментальных животных, повреждая печень и почки. Вместе с тем и в контрольных, и в опытных группах падежа животных не было. Они оставались активными и хорошо потребляли корм.

При естественном поступлении через рот «Бакцер» в дозе $1 \cdot 10^7$ м.к. мл изменения в желудочно-кишечном тракте в опыте и в контроле можно расценить как активацию обновления эпителиального пласта желудка и толстого кишечника и увеличение выделения секрета из бокаловидных клеток. «Бакцер» не приводил к дополнительным гистологическим изменениям во внутренних органах, ответственных за детоксикацию и выделение (печень и почки), развившихся от действия иммунодепрессанта.

При посеве фекалий этих животных на мясо-пептонный агар, среду Эндо и ЖСА роста не было, бактерии также не высевались. В контрольной группе на среде Эндо был рост, характерный для лактозопозитивной кишечной палочки, а на ЖСА росли бактерии, идентифицированные как стафилококки.

При внутрибрюшинном введении $5 \cdot 10^7$ м.к. бакцилл, один из трёх штаммов (*B. cereus* 42 - факультативный анаэроб) был высеван из брюшной полости. При этом на фоне иммунодепрессанта отмечали гистологические признаки, характерные для амилоидоза печени и селезёнки, обусловленные длительной (в течение 14 суток) персистенцией в организме этого штамма. Однако и после пребывания в организме животного у штамма *B. cereus* 42 не появилась гемолитическая и протеазная активность, не изменилась чувствительность к антибиотикам.

Санитизирующий эффект экспериментального препарата «Бакцер» на кожные раны

В ранах, инфицированных смесью условно-патогенных микроорганизмов, после двукратной их обработки «Бакцер» из исходных или модифицированных температурой *B. cereus* 42, 45, 46 в дозе $3 \cdot 10^3$ или $3 \cdot 10^5$ м.к./мл уже на 2-е сутки условно-патогенная микрофлора была представлена только стафилококками (*S. aureus*, *S. epidermidis*), колониеобразующих единиц которых было в среднем 100-110 из одной раны. Выделенные из ран микроорганизмы приобретали большую чувствительность к антибиотикам, тогда как в контроле отмечен сплошной рост стафилококков, и присоединялась грамотрицательная микрофлора, (*Serratia sp* или *Klebsiella oxytoca*). В ранах бактерии не приживались даже на фоне обработки мышей «Циклоспорин Гексал». Раны заживали у опытных животных быстрее, вне зависимости от фона (животные с или без предварительной обработкой иммунодепрессантом). Одинаково эффективны были препараты из исходных и модифицированных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46. Гистологические исследования биоптатов ран показали наличие активированных макрофагов и менее выраженные признаки воспалительного процесса у мышей опытных групп (Рисунок 1).

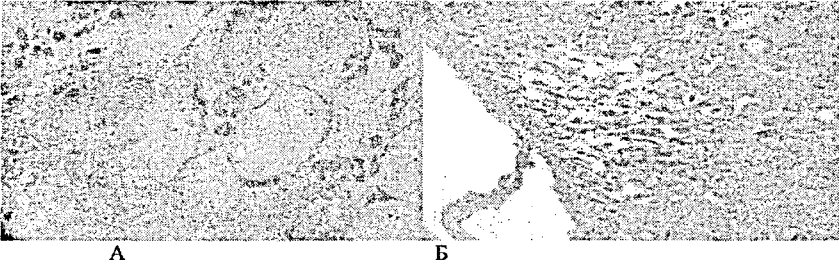


Рисунок 1– Гистологические изменения в ранах у мышей через 8 суток после аппликации на инфицированные раны «Бакцер». Условные обозначения: А-активированные макрофаги в молодой грануляционной ткани при обработке в дозе $3 \cdot 10^3$ м.к./мл. Гематоксилин-эозин, X 400; Б-замещение раневого дефекта молодыми коллагеновыми волокнами, большое количество фибробластов при обработке в дозе $3 \cdot 10^5$ м.к./мл. Гематоксилин-эозин, X 200

Размеры ран на 3-и сутки у экспериментальных животных становились меньше чем у контрольных мышей и достигали минимальных величин на 7-е сутки. Уменьшение размеров ран было достоверным ($P=0,05$).

При сравнительных исследованиях эффективности «Бакцер» и культуры, выращенной из препарата «Бактисубтил», которыми обрабатывали раны, инфицированные *P. aeruginosa* 128, оказалось, что этот штамм в ранах не приживался, а вместо него из раневого отделяемого на питательных средах выделена *Klebsiella oxytoca*. Из ран, обработанных культурой из препарата «Бактисубтил», высевалось в пять раз больше этих бактерий, чем из ран обработанных «Бакцер», и дополнительно - бациллы. Спустя 3 суток размеры ран у животных, обрабатываемых «Бакцер» были меньше на 0,5 см по сравнению с ранами, на которые наносили культуру из «Бактисубтил».

Опилки, обработанные экспериментальным препаратом, препятствовали нагноению ран у лабораторных животных.

Раны у сельскохозяйственных животных также хорошо санировались и быстрее заживали от «Бакцер» по сравнению с общепринятыми в ветеринарии антисептиками и химиотерапевтическими препаратами (йод, стрептоцид, мазь левомицетиновая).

Пробиотическая активность «Бакцер»

Результаты влияния экспериментального биопрепарата на микрофлору желудочно-кишечного тракта цыплят представлены в таблице 4.

Как хорошо видно из таблицы 4, общее количество микроорганизмов повышалось от обоих препаратов «Бакцер» и «Ветом 1.1.» и в зобе, и в слепых отростках практически одинаково у цыплят в возрасте 24 суток по сравнению с контролем. Аналогично изменялись и молочнокислые бактерии, но от «Ветом 1.1.» их уровень был выше, чем от «Бакцер», в 1,6 и 1,7 раза, соответственно в зобе и слепых отростках. Бифидобактерии в большей мере увеличивались в

зобе от «Ветом 1.1.», несколько ниже их уровень был от «Бакцер», а в слепых отростках количество этих микроорганизмов было больше при введении экспериментального препарата. Лактатферментирующие бактерии в зобе увеличивались от «Ветом 1.1.», но уменьшались от «Бакцер». В слепых отростках их уровень от обоих препаратов практически одинаково увеличивался по сравнению с контролем у цыплят 24-суточного возраста. В обоих исследованных органах возрастал уровень целлюлозолитических бактерий, особенно от «Ветом 1.1.». В отношении стрептококков и бактерий группы кишечной палочки отмечена иная динамика. У цыплят 24-суточного возраста их количество было снижено от «Бакцер» и от «Ветом 1.1.», особенно значительно снижались бактерии группы *E. coli* (Таблица 4). С возрастом цыплят (40-суточные) влияние пробиотиков было не столь значительным, как у 24-дневных. Общее количество бактерий у интактных цыплят возрастало, а от обоих препаратов по сравнению их уровнем у 24-суточных не изменялось в зобе и слепых отростках. У опытных групп уровень молочнокислых и бифидобактерий несколько снижался, содержание лактатферментирующих бактерий незначительно увеличивалось, мало изменялся уровень целлюлозолитических бактерий. Уровень бактерий группы *E. coli* несколько снижался по сравнению с первым сроком исследования, а количество стрептококков умеренно возрастало (Таблица 4).

Таблица 4 – Микрофлора желудочно-кишечного тракта цыплят-бройлеров при даче пробиотиков на основе бактерий рода *Vacillus* (Мг/г)

Представители различных бактерий желудочно-кишечного тракта	Возраст			24 дня			40 дней					
	Группа	Интактные	«Баклер»	«Ветом 1.1.»	Интактные	«Баклер»	«Ветом 1.1.»					
								3	4	5	6	7
1	2											
Общее количество микроорганизмов, млрд/г	Зоб	8,43±0,07*	26,26±3,54	26,20±0,9	12,42±0,48*	26,58±1,20	26,48±1,05					
	Слепые отростки	27,39±2,76*	57,07±9,67	57,58±4,45*	22,33±2,98	57,98±3,11	57,70±13,07					
Молочнокислые млн/г	Зоб	1,95±0,48	23,03±0,98	38,0±11,49	0,15±0,0005*	0,5±0,02	0,45±0,017					
	Слепые отростки	19,5±0,96*	41,0±10,79	69,5±1,66*	3750,0±1123,0	13875,0±1031,0	12900,0±1910,0					
Лактаферментпродуци е, млн/г	Зоб	0,0002±0,008	0,00009±0,004	0,0008±0,003	0,0006±0,0005	0,15±0,0012*	0,13±0,003*					
	Слепые отростки	0,0014±0,003	0,014±0,007*	0,01±0,001*	0,014±0,0003	1,22±0,001	0,4±0,007					
Бифидобактерии, млн/г	Зоб	2,05±0,096*	17,18±0,24*	20,25±5,97*	3,0±11,31	20,75±3,77*	20,5±18,19					
	Слепые отростки	17,75±10,06	30,25±3,45	27,5±13,58	12,5±2,87	28,5±4,79	23,25±4,05					

1	2	3	4	5	6	7	8
Стрептококки, млн/г	Слепые отrostки	352,5±60,0*	37,75±10,32	50,0±15,01	28,0±62,0	39,0±10,79	5,75±2,97
	Зоб	21,5±2,87*	15,75±3,09	13,5±0,96	67,75±12,23	24,0±3,14*	52,5±2,87
	Слепые отrostки	45,45±0,16	29,75±2,43	38,0±0,41	252,3±0,15	49,1±1,31*	84,8±3,82*
Целлюлолитические, тип	Зоб	1:10 ⁴	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ³	1:10 ³	1:10 ⁴
	Слепые отrostки	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁴	1:10 ³	1:10 ³	1:10 ⁵

Примечание – «*» – различия между опытной и контрольной группами достоверны при $p \leq 0,05$ здесь и далее.

Выводы

1. Экспериментально обоснован поиск во внешней среде – микробиоценозе ветеринарного госпиталя апатогенных штаммов *Bacillus cereus* с опосредованной антагонистической активностью по отношению к условно патогенным грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам.

2. Установлено, что чистая культура отобранных штаммов *B. cereus* 42, 45, 46 обладала типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами, присущими виду, но не имела факторов патогенности и не приобрела их даже на фоне токсического действия на организм лабораторных животных иммуносупрессора «Циклоспорин».

3. Отмечено, что хранение в течение месяца при температуре 39-40 °С культур *B. cereus* 42, 45, 46 приводило к их модификационной изменчивости с утратой опосредованного действия на тестируемые микроорганизмы, но с приобретением прямого, антагонизма за счет роения, присущего культуре из официального пробиотика «Бактисубтил».

4. Сформулированы критерии отбора штаммов *B. cereus*-антагонистов условно патогенных микроорганизмов, согласно которым они должны быть изначально апатогенными, обладать опосредованным и (или) прямым антагонизмом широкого спектра действия по отношению к бактериям и кандидам, ранозаживляющим и пробиотическим эффектами, иметь типичные морфологические, культуральные и биохимические признаки; не приживаться в макроорганизме и не приобретать факторы патогенности, в том числе на фоне иммунодепрессанта, не повышать устойчивость к антибиотикам.

5. Показано, что экспериментальный биопрепарат, полученный из смеси штаммов *B. cereus* 42, 45, 46, обладал санирующим и ранозаживляющим действием при наружном применении у лабораторных и сельскохозяйственных животных, в 5 раз превышающим эффективность культуры, выращенной из официального препарата «Бактисубтил».

6. Установлено, что данный экспериментальный препарат обладал пробиотическими свойствами, аналогичными ветеринарному пробиотику «Ветом 1.1.».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Позднякова И.Г. Санитарно-микробиологическое исследование воздуха в госпитале для животных / И.Г. Позднякова, А.С. Рыхлов, Л.С. Назарова // Научно-практическая конференция профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам научно-исследовательской и учебно-методической работы за 2010 г. – Саратов, 2010. – С. 64 – 67.

2. Позднякова И.Г. Межпопуляционные отношения в микробиоценозах ветеринарного госпиталя / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Стратегия

взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Тез. пятой Всероссийской конференции молодых учёных. – Саратов, 2010. – С. 103.

3. Позднякова И.Г. Пробиотические свойства апатогенных госпитальных штаммов *Bacillus cereus* / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Вавиловские чтения - 2010: материалы Междунар. научно-практической конференции. – Саратов, 2010. – С. 167 – 168.

4. Позднякова И.Г, Механизмы антагонистического действия *Bacillus cereus* на *Pseudomonas aeruginosa* / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Актуальные проблемы современной ветеринарии, посвященной 65-летию ветеринарной науки Кубани: материалы Международной науч.- практ. конф. – Краснодар, 2011. – С. 119 – 122.

5. Назарова Л.С. Микробиологический и гистологический контроль безопасности пробиотических штаммов *Bacillus cereus* / Л.С. Назарова, И.Г. Позднякова // Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии и селекции животных: материалы конференции посвящены 80-летию доктора ветеринарных наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Демкина Григория Прокофьевича. – Саратов, 2011. – С. 54 – 55.

6. Позднякова И.Г. Факторы, обуславливающие антагонистический эффект *Bacillus cereus* / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Актуальные проблемы ветеринарной патологии, физиологии, биотехнологии и селекции животных: материалы конференции посвящены 80-летию доктора ветеринарных наук, профессора, заслуженного деятеля науки РФ Демкина Григория Прокофьевича. – Саратов, 2011. – С. 57 – 59.

7. Позднякова И.Г. Клинические изоляты пробиотических штаммов *Bacillus cereus* как санирующие агенты кожных ран животных / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения: материалы Междунар. науч.-практ. конф. посвященной Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – Ульяновск, 2011. – С. 23 – 25.

8. Ларина Е.К. Характеристика изменчивости у пробиотических штаммов *Bacillus cereus* / Ларина Е.К., Л.С. Назарова, И.Г. Позднякова // Материалы IV-й Всероссийской студенческой научной конференции. – Ульяновск, 2011. – С. 97 – 99.

9. Позднякова И.Г. К вопросу о влиянии штаммов *Bacillus cereus* со свойствами пробиотиков на организм экспериментальных животных при пероральном введении иммунодепрессанта / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 9. – С. 6 – 9.

10. Позднякова И.Г. Сравнительные характеристики официального пробиотического препарата Бактисубтил и апатогенных клинических изолятов *Bacillus cereus* со свойствами пробиотиков / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // Естественные и технические науки. – 2011. – № 4. – С. 173 – 174.

11. Позднякова И.Г. Характеристика микробной контаминации стационара госпиталя для животных / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова // **Ветеринарный врач.** – 2011. – № 3. – С. 23 – 25.

12. Назарова Л.С. Новые подходы в лечении инфицированных ран кожного покрова / Л.С. Назарова, Г.А. Кутузова, И.Г. Позднякова // **Вестник ветеринарии.** – 2012. – № 1. – С. 37 – 38.

13. Пат. 2435864 Способ пробиотической обработки клеток с содержащимися в них мелкими непродуктивными животными в условиях ветеринарного госпиталя / И.Г. Позднякова, Л.С. Назарова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». - № 2010134456; заявл. 17. 08. 2010; опубл. 10.12.2011.

Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная. Подписано в печать 14.11.2013.
Гарнитура Times. Печать Riso.
Усл. печ. л. 1,00. Тираж 100 экз. Заказ 0446

Отпечатано с готового оригинал-макета в типографии
ИП «Экспресс тиражирование»
410005, Саратов, Пугачёвская, 161, офис 320 ☎ 27-26-93