

УДК 619:579.6.62:615.33

ВЛИЯНИЕ ВОЗРАСТА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *E. COLI* ATCC 25222 И *S. ENTERITIDIS* 182 IN VITRO

¹Н. Н. Шкиль, кандидат ветеринарных наук¹Е. В. Филатова, младший научный сотрудник²В. Н. Чебаков, кандидат сельскохозяйственных наук³А. Н. Швыдков, кандидат сельскохозяйственных наук³Н. Н. Ланцева, доктор сельскохозяйственных наук,
профессор³Л. А. Кобцева, аспирант¹Институт экспериментальной ветеринарии Сибири
и Дальнего Востока Россельхозакадемии²ИП Чебаков³Новосибирский государственный аграрный университет

E-mail: rector@nsau.edu.ru

Ключевые слова: антибиотикочувствительность, микроорганизм, пробиотик, антибиотик, антибиотикорезистентность, условно-патогенная микрофлора, молочно-кислая кормовая добавка, микроорганизмы, влияние супернатантов, микрофлора, культивирование

Реферат. Супернатанты монокультур молочно-кислой кормовой добавки (МКД) на основе микроорганизмов пробиотиков *Lactobacillus acidophilus* L-41, *Streptococcus thermophilus* B-41, *Bifidobacter longum* B-41, *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76 с 1-го по 30-й день с момента культивирования, при контакте в течение 18–20 ч в различной степени повышают антибиотикочувствительность *E. coli* ATCC 25222 и *S. enteritidis* 182. Наибольший рост чувствительности *E. coli* ATCC 25222 к антибактериальным препаратам (от 41,7 до 54,2%), отмечен после культивирования с пробиотическими культурами 20- и 30-дневного возраста. Контакт супернатантов всех изучаемых монокультур МКД, полученных на 10-й и 30-й день их культивирования с *S. enteritidis* 182 с последующим определением антибиотикочувствительности, вызывает большее увеличение диаметра задержки роста микроорганизмов, чем 20-дневные культуры. Проведённые исследования открывают перспективы изучения влияния метаболитов пробиотических микроорганизмов в составе МКД на антибиотикочувствительность условно-патогенной микрофлоры, что способствует решению проблемы антибиотикорезистентности и, как следствие, повышению эффективности лечебно-профилактических ветеринарных мероприятий в животноводстве.

Массовое, бессистемное применение антибактериальных средств в ветеринарии и медицине привело к образованию антибиотикоустойчивых рас микроорганизмов, что снизило эффективность терапии инфекционных заболеваний. В связи с этим возрастает интерес к экологически безопасным средствам профилактики и лечения инфекционных заболеваний, не вызывающим изменения биологических свойств и формирования новых антибиотикорезистентных штаммов возбудителей (пробиотики, сорбенты, гомеопатические препараты, иммуностимуляторы, кормовые добавки и др.) [1–3].

Многочисленными исследованиями доказано позитивное влияние пробиотических культур микроорганизмов, которые проявляют антагонистическую активность в отношении условно-патогенных микробиоценозов желудочно-кишечного тракта, а также активизируют обменные процес-

сы, биосинтез белка и витаминов, нормализуют окислительно-восстановительные реакции, стимулируют клеточные и гуморальные звенья иммунной системы [4–11]. Установлено, что в процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений (бактериоцины), являющихся метаболитами, которые избирательно действуют на условно-патогенные микроорганизмы. Так, лизоцим снижает способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, а перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Бактериоцины обладают общим бактериостатическим действием на грамотрицательную микрофлору [12].

Известно, что важным фактором в реализации патогенности условно-патогенной микрофлоры является антибиотикорезистентность, которая значительно снижает терапевтические возмож-

ности химиотерапии. В настоящее время остаётся малоизученным вопрос влияния пробиотиков на показатели антибиотикочувствительности условно-патогенной микрофлоры, результаты исследований которых могут определять стратегию использования и круг препаратов при лечении инфекционных заболеваний [13–16].

Цель исследований – изучить влияние супернатантов, полученных из молочно-кислой кормовой добавки разного возраста, на антибиотикочувствительность *E. coli* ATCC 25222 и *S. enteritidis* 182 in vitro к различным видам антибиотиков.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние супернатантов (надосадочной жидкости) МКД-В на основе микроорганизмов пробиотиков *Bifidobacter longum* Б-41, МКД-S на основе *Streptococcus thermophilus* В-41, МКД-Р на основе *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76, МКД-L на основе *Lactobacillus acidophilus* Л-41 определяли при культивировании с 2 видами условно-патогенной микрофлоры (*S. enteritidis* 182, *E. coli* ATCC 25222). В исследованиях использовали супернатанты МКД (В, S, Р, L), полученные в разные сроки их культивирования (на 1, 10, 20 и 30-й день после получения готового продукта МКД). Для исследования брали 0,5 мл среды МПБ, добавляли 0,5 мл супернатанта МКД, а после вносили 0,5 мл МПБ, суточной культуры одного из штаммов условно-патогенной микрофлоры и инкубировали 18–20 ч при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Определение антибиотикочувствительности микроорганизмов проводили на питательной среде МПА с 24 видами антибактериальных препаратов дискодиффузионным методом по методическим рекомендациям Отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии «Лабораторные методы исследований инфекционной патологии животных» (2008). Критерием антибиотикочувствительности микроорганизмов служил диаметр задержки их роста вокруг диска антибактериального препарата. При зоне задержки роста до 10 мм культура считалась устойчивой к антибактериальному препарату, до 15 – малочувствительной, более 15 мм – чувствительной. Оценку антибиотикочувствительности проводили по изменению диаметра задержки роста вокруг диска антибио-

тика и по изменению количества устойчивых, малочувствительных и чувствительных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение роста антибиотикочувствительности штаммов микроорганизмов *E. coli* ATCC 25222 и *S. enteritidis* 182 после контакта с супернатантом *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76 показало прямую зависимость от срока его культивирования и было максимальным на 30-й день (табл. 1).

Наибольший рост антибиотикочувствительности *E. coli* ATCC 25222 отмечен после контакта с супернатантами МКД-S 30-дневного и МКД-В 20-дневного культивирования – к 54,2 % препаратов.

Максимальный рост антибиотикочувствительности *S. enteritidis* 182 установлен после взаимодействия с 30-дневными супернатантами культур МКД-S (к 45,8 % исследуемых препаратов) и МКД-В, МКД-Р, МКД-L (к 41,7 % исследуемых препаратов).

Изучение антибиотикочувствительности штаммов *E. coli* ATCC 25222 и *S. enteritidis* 182 после контакта с супернатантами у 30-дневных культур изучаемых разновидностей МКД выявило максимальное увеличение диаметра задержки роста микроорганизмов – от 55,1 до 75,0 % (табл. 2). Однако рост этого показателя у данных микроорганизмов значительно отличался в течение срока наблюдения. Так, при контакте *E. coli* ATCC 25222 с супернатантами МКД всех видов пробиотиков отмечен рост антибиотикочувствительности с увеличением возраста культуры. Рост антибиотикочувствительности *S. enteritidis* 182 при контакте с супернатантами МКД-L и МКД-S имел максимальные значения в 1-й (40,9 и 43,9 % соответственно) и 30-й дни (62,5 и 70,6 % соответственно), а минимальные – на 20-й день культивирования.

При культивировании *S. enteritidis* 182 с супернатантами 20-дневных культур МКД-В и МКД-Р также отмечено снижение антибиотикочувствительности относительно этого показателя у 10- и 30-дневных культур.

Результаты исследования изменения антибиотикочувствительности *S. enteritidis* 182 и *E. coli* ATCC 25222 после контакта супернатантами всех изучаемых видов пробиотических кормовых добавок выявили прямую зависимость роста чувствительности от возраста МКД. При этом рост

Таблица 1

Влияние супернатантов пробиотиков разного срока культивирования на количество антибактериальных препаратов, к которым чувствительна условно-патогенная микрофлора после контакта с супернатантом пробиотиков, %

Микро-организмы	1-й день			10-й день			20-й день			30-й день		
	у	м	ч	у	м	ч	у	м	ч	у	м	ч
<i>Контрольная группа</i>												
<i>S. enteritidis</i> 182	19/79,1	4/16,7	1/4,2	17/70,8	5/20,8	2/8,4	17/70,8	7/29,2	-	18/75	4/16,7	2/8,4
<i>E. coli</i> ATCC 25222	17/70,8	4/16,7	3/12,5	16/66,6	6/25	2/8,4	18/75	4/16,7	2/8,3	16/66,6	5/20,8	3/12,6
<i>МКД-L</i>												
<i>S. enteritidis</i> 182	18/75	-	6/25	16/66,6	2/8,4	6/25	14/58,3	1/4,2	9/37,5	14/58,3	-	10/41,7
<i>E. coli</i> ATCC 25222	16/66,6	4/16,7	4/16,7	15/62,5	3/12,5	6/25	14/58,3	-	10/41,7	14/58,3	-	10/41,7
<i>МКД-S</i>												
<i>S. enteritidis</i> 182	18/75	-	6/25	17/70,8	1/4,2	6/25	16/66,6	-	8/33,4	13/54,2	-	11/45,8
<i>E. coli</i> ATCC 25222	16/66,6	2/8,4	6/25	15/62,5	-	9/37,5	13/54,2	-	11/45,8	11/45,8	-	13/54,2
<i>МКД-B</i>												
<i>S. enteritidis</i> 182	17/70,8	-	7/29,2	15/62,5	1/4,2	8/33,3	14/58,3	-	10/41,7	14/58,3	-	10/41,7
<i>E. coli</i> ATCC 25222	15/62,5	4/16,7	5/20,8	13/54,2	6/25	5/20,8	11/45,8	-	13/54,2	14/58,3	-	10/41,7
<i>МКД-P</i>												
<i>S. enteritidis</i> 182	18/75	1/4,2	5/20,8	16/66,6	-	8/33,4	15/62,5	-	9/37,5	14/58,3	-	10/41,7
<i>E. coli</i> ATCC 25222	16/66,6	2/8,4	6/25	14/58,3	1/4,2	9/37,5	13/54,2	-	11/45,8	12/50	-	12/50

Примечание. Микрофлора устойчива – «у»; малочувствительна – «м»; чувствительна – «ч».

Таблица 2

Диаметр задержки роста микроорганизмов при исследовании антибиотикочувствительности дискосиффузионным методом после контакта с супернатантами культур пробиотиков разных сроков культивирования

Микроорганизм	1-й день	%	10-й день	%	20-й день	%	30-й день	%
<i>Контрольная группа</i>								
<i>S. enteritidis</i> 182	13,2±0,6	-	13,3±0,5	-	13,0±0,1	-	13,6±0,3	-
<i>E. coli</i> ATCC 25222	13,1±0,4	-	13,6±0,4	-	13,0±0,5	-	13,6±0,6	-
<i>МКД-L</i>								
<i>S. enteritidis</i> 182	18,6±0,9*	40,9	18,0±0,8*	35,3	19,2±0,1*	32,3	22,1±1,5*	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25222	15,0±0,4*	14,5	16,2±0,4*	19,1	17,5±0,5*	25,7	21,1±0,7*	55,1
<i>МКД-S</i>								
<i>S. enteritidis</i> 182	19,0±0,2*	43,9	19,0±0,4*	42,8	19,3±0,1*	33	23,2±0,1*	70,6
<i>E. coli</i> ATCC 25222	15,6±0,7*	19,1	17,1±0,2*	25,7	17,6±0,9*	26,1	22±1,4*	62
<i>МКД-B</i>								
<i>S. enteritidis</i> 182	17,4±0,7*	31,8	18,3±0,7*	37,6	19,8±0,1*	34,3	22,6±0,8*	66,2
<i>E. coli</i> ATCC 25222	15,6±0,3*	19,1	17,2±0,1*	26,4	21,7±1,4*	40	22,7±1,2*	67
<i>МКД-P</i>								
<i>S. enteritidis</i> 182	16,3±0,5*	23,5	19,6±0,7*	47,4	23,3±1,2*	44,2	23,8±0,9*	75
<i>E. coli</i> ATCC 25222	15,7±0,9*	19,8	17,3±0,1*	27,2	22,5±1,4*	42,2	23,2±1,5*	70

*P<0,05.

антибиотикочувствительности *S. enteritidis* 182 выражался в большем увеличении диаметра задержки роста микроорганизмов к отдельным антибактериальным препаратам на 33,3–41,7%,

а антибиотикочувствительности у *E. coli* ATCC 25222 – в увеличении количества препаратов, к которым проявляется чувствительность (на 41,7–54,2%).

Таким образом, проведённые исследования открывают перспективы изучения влияния метаболитов пробиотических микроорганизмов в составе МКД на антибиотикочувствительность условно-патогенной микрофлоры, что может способствовать решению проблемы антибиотикорезистентности, и как следствие, повышению эффективности лечебно-профилактических ветеринарных мероприятий в животноводстве.

ВЫВОДЫ

1. Супернатанты монокультур МКД на основе микроорганизмов пробиотиков *Lactobacillus acidophilus* L-41, *Streptococcus termophilus* B-41, *Bifidobacter longum* B-41, *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76 с 1-го по 30-й день культивирования в различной степени повышают антибиотикочувствительность у *E. coli* ATCC 25222 и *S. enteritidis* 182. Полученные данные дают основание для дальнейшего изучения влияния антагонистических свойств различных комбинаций штаммов пробиотиков в отно-

шении представителей условно-патогенной микрофлоры и оценки влияния на её антибиотикочувствительность.

2. Культивирование *E. coli* ATCC 25222 с 20- и 30-дневными культурами пробиотических штаммов вызывает больший рост чувствительности к антибактериальным препаратам (на 41,7–54,2%), чем у *S. enteritidis* 182 (на 33,3–41,7%).
3. Контакт супернатантов всех изучаемых МКД на 10-й и 30-й день их культивирования с *S. enteritidis* 182 с последующим определением антибиотикочувствительности вызывает большее увеличение диаметра задержки роста микроорганизмов, чем 20-дневные культуры. Рост антибиотикочувствительности *E. coli* ATCC 25222 после контакта с супернатантами МКД-L на основе *Lactobacillus acidophilus* L-41, МКД-S на основе *Streptococcus termophilus* B-41, МКД-B на основе *Bifidobacter longum* B-41, МКД-P на основе *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76 находится в прямой зависимости от возраста пробиотической культуры.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Иммуномодуляторы нуклеиновой природы как стимуляторы неспецифической резистентности и продуктивности молодняка крупного рогатого скота: рекомендации / Г. А. Ноздрин, И. В. Наумкин, А. С. Донченко [и др.]; РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 1992. – С. 1–20.
2. Препараты из торфа для лечения молодняка при диарее / В. И. Раицкая, В. М. Севостьянова, О. П. Панина [и др.] // Ветеринария. – 2000. – № 4. – С. 48–50.
3. Краснюк И. И., Михайлова Г. В. Фармацевтическая гомеопатия: учеб. пособие. – М., 2005. – С. 165–204.
4. Ноздрин Г. А. Фармакологическая коррекция иммунодефицитов у телят в ранний постнатальный период жизни: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – СПб., 1996. – С. 11–35.
5. Ноздрин Г. А., Карачковская В. А., Каракулова О. А. Применение пробиотиков для ускорения роста и развития цыплят // Актуальные вопросы ветеринарии. – Новосибирск, 2001. – С. 97–98.
6. Научные основы применения, пробиотиков в птицеводстве: монография / Г. А. Ноздрин, А. Б. Иванова, А. И. Шевченко [и др.]; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2005. – С. 105–116.
7. Пробиотики и микронутриенты при интенсивном выращивании цыплят кросса Смена: монография / Г. А. Ноздрин, А. Б. Иванова, А. И. Шевченко [и др.]; Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2009. – С. 65–73.
8. Профилактическая и ростостимулирующая эффективность жидких форм Ветоба при применении их новорожденным телятам / Г. А. Ноздрин, А. Г. Ноздрин, А. Б. Иванова [и др.] // Достижения науки и техники АПК. – 2012. – № 10. – С. 34–39.
9. Антипов В. А. Использование пробиотиков в животноводстве // Ветеринария. – 1991. – № 4. – С. 55–56.
10. Использование пробиотиков в бройлерном производстве / А. Н. Швыдков, Л. А. Кобцева, Р. Ю. Килин [и др.] // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2013. – № 2. – С. 40–47.
11. Эффективность использования пробиотиков в бройлерном птицеводстве / А. Н. Швыдков, Р. Ю. Килин, Т. В. Усова [и др.] // Главный зоотехник. – 2013. – № 5. – С. 22–29.

12. Панин А. Н., Малик Н. И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных // Ветеринария. – 2006. – № 7. – С. 34–38.
13. Чебаков В. П., Швыдков А. Н., Богатырева Г. В. Использование молочно-кислой кормовой добавки с пробиотиками в рационах сельскохозяйственных животных: метод. рекомендации / РАСХН. Сиб. отд-ние. СибНИПТИП. – Новосибирск, 2005. – С. 5–13.
14. Поиск альтернативы антибиотикам в бройлерном птицеводстве / А. Н. Швыдков, С. Ю. Жбанова, О. С. Котлярова [и др.] // Птицеводство. – 2012. – № 11. – С. 35–39.
15. Кобцева Л. А., Ланцева Н. Н., Швыдков А. Н. Изучение свойств монокультур молочно-кислой кормовой добавки // I Регион. юбил. науч.-практ. конф. «Сибирская наука – проблемы и перспективы технологии производства и переработки продукции животноводства». ФБГОУ ВПО АГАУ. – Барнаул, 13–15 нояб. 2013 г. – Барнаул, 2013.
16. Николаева Е. Н., Незавитин А. Г., Швыдков А. Н. Влияние пробиотических культур на рост и развитие цыплят-бройлеров // Вестн. НГАУ. – 2012. – № 2 (23). – С. 68–74.

THE INFLUENCE OF AGE OF MICROORGANISM PROBIOTIC CULTURES ON THE CHANGE IN ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF STRAINS *E. COLI* ATCC 25222 AND *S. ENTERITIDIS* 182 IN VITRO

N. N. Shkil, E. V. Filatova, V. N. Chebakov, A. N. Shvydkov, N. N. Lantseva, L. A. Kobtseva

Key words: antibiotic sensitivity, microorganism, probiotic, antibiotic resistance, opportunistic pathogenic microflora, lactic acid feed additive, supernatants influence, microflora, cultivation

Summary. Supernatants of monocultures of lactic acid feed additive (LFD) based on the microorganisms of the probiotics *Lactobacillus acidophilus* L-41, *Streptococcus thermophilus* B-41, *Bifidobacter longum* B-41, *Propionobacterium freudenreichii shermanii* 76 enhance antibiotic sensitivity in *E. coli* ATCC 25222 and *S. enteritidis* 182 to different extents from the 1st to the 30th day since the start of cultivation when contacting for 18–20 hours. The highest growth of sensitivity in *E. coli* ATCC 25222 to antibacterial preparations (from 41.7 to 54.2 %) is marked after the cultivation with probiotic cultures aged 20 and 30 days. The contact of the supernatants of all the LFD monocultures concerned and obtained on the 10th and 30th day of their cultivation with *S. enteritidis* 182 followed by antibiotic sensitivity determined causes the diameter of microorganisms growth delay to increase more than it does in the 20-day cultures. The examinations conducted offer the challenges to study the influence of metabolites of probiotic microorganisms in LFD composition for antibiotic sensitivity of opportunistic pathogenic microflora, which assists in solving the problem of antibiotic resistance and consequently, enhancing the efficiency of treatment-and-prophylactic veterinary events in livestock-breeding.