

2. Мандро, Н. М. Рекомендации по применению белкового препарата из клеток костного мозга / сост. д-р ветеринар. наук, профессор Н. М. Мандро; Т. В. Федоренко. – Благовещенск: Изд-во Дальневосточного ГАУ, 2016. – 21 с. Патента RU 2553334 от 18 мая 2015 г.).

УДК 636.087.8 (047.31)

**ПРОВЕРКА АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И
ИСПЫТАНИЯ ПАТОГЕННОСТИ И ТОКСИГЕННОСТИ
ОТОБРАННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ**

Михалюк А. Н., Малец А. В., Сехин А. А.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь

Для профилактики здоровья молодняка необходимо поддерживать популяцию полезных бактерий в пищеварительном тракте. Поэтому важно при его выращивании создавать необходимые условия, обеспечивающие формирование собственного микробиоценоза, включая применение средств, в т. ч. пробиотиков, способствующих формированию микрофлоры в нужном для организма направлении [1, 2, 3].

Возможности использования пробиотиков в ветеринарии затрагивают довольно широкий круг проблем, начиная от коррекции кишечного биоценоза и распространяясь на коррекцию иммунной, гормональной и ферментативной систем молодняка. В этой связи отечественные и зарубежные ученые считают необходимым внедрение пробиотиков в систему выращивания животных для профилактики неинфекционных желудочно-кишечных заболеваний молодняка, поддержания колонизационной резистентности кишечника, повышения физиологического статуса организма новорожденных животных, стимуляции роста и развития, получения качественной продукции, безопасной в ветеринарно-санитарном отношении [1].

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение антагонистических свойств и испытания патогенности и токсигенности отобранных штаммов бактерий-антагонистов, перспективных для создания кормовой добавки, на лабораторных животных.

Исследования проводились в виварии, научно-исследовательской лаборатории, а также кафедре микробиологии и эпизоотологии УО «Гродненский государственный аграрный университет».

В начале исследований отобранные в лаборатории биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси 6 штаммов ба-

цилл, перспективных для создания кормовой добавки (*Bacillus velezensis* 19, *Bacillus velezensis* 40, *Bacillus velezensis* К 9, *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus subtilis* 14, *Bacillus subtilis* 16), подвергли исследованиям с целью изучения антагонистической активности по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам сельскохозяйственных животных.

С целью проверки антагонистических свойств изучаемых штаммов по 1 мл каждого штамма бациллярной культуры было засеяно сплошным газоном на чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА). Для этого суспензия микроорганизмов наносилась на поверхность питательной среды и выдерживалась 30 мин. После чего ее тщательно сливали, а чашки помещали в термостат для роста культур при температуре 37°C.

Одновременно с этим проводилось выделение условно-патогенных культур микроорганизмов из молока коров, больных маститом, после начатого лечения и молока коров, подготавливаемых на забоявание маститом, а также подстилки для проверки на них антагонистических свойств бацилл. Для выделения микроорганизмов из этих сред были использованы две питательные среды – МПА и Эндо.

Для молока и для подстилки перед посевом делались десятикратные разведения на физрастворе. Молоко от коров с субклинической формой мастита и от коров с клинической формой высеивали на среды Эндо и МПА из 2 и 3 разведения поверхностным методом, нанося на чашки с питательной средой по 0,05 мл соответствующего разведения и в дальнейшем растирая стерильным стеклянным шпателем. Посев подстилочного материала проводили из 4-го и 5-го разведений. Чашки с посевами выдерживали в термостате в течение 48 ч при температуре 37°C. Отдельные, отобранные нами колонии, были использованы для посева с целью размножения на сектора чашек с МПА. Одновременно с этим посевом готовились препараты-мазки для просмотра под микроскопом.

С целью определения острой и хронической токсичности штаммов бацилл был проведен опыт на беспородных белых крысах (самках) массой 186-222 г. Для проведения опыта по принципу пар-аналогов подбирали клинически здоровых крыс, которые были распределены на 7 групп (6 – опытных и 1 – контрольная) по 10 особей в каждой. Животных содержали в пластиковых клетках в условиях искусственного освещения при температуре 20-22°C и относительной влажности 60-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные получали стандартный рацион вивария и воду. Кормление производили один раз в день в утренние часы, замену

подстилки – три раза в неделю. За 12 ч до забоя животных лишали пищи.

Для определения безвредности культуры спорообразующих бактерий вводили орально белым крысам в дозе 3 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 сут.

Для определения токсигенности культуры бацилл вводили крысам (4-5 голов) в области стопы задней правой лапки в дозе 0,1 мл, в качестве контроля использовали стерильную питательную среду, используемую для культивирования штаммов бацилл, которые вводили в области стопы задней левой лапки в дозе 0,1 мл.

Для определения аллергенности изучаемые штаммы бацилл вводили крысам внутрикожно в дозе 0,04 мл в течение 3 сут.

Для определения токсичных свойств штаммы бацилл вводили белым крысам внутривенно в дозе 3,0 мл. За животными вели наблюдение в течение 14 дней.

Результаты, полученные на первом этапе исследований, показали, что в условиях *in vitro* отобранные монокультуры бацилл (*Bacillus velezensis* 19, *Bacillus velezensis* 40, *Bacillus velezensis* К 9, *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus subtilis* 14, *Bacillus subtilis* 16) проявляют высокую антагонистическую активность, подавляют рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

На втором этапе исследований были проведены испытания патогенности и токсигенности отобранных штаммов бактерий-антагонистов на лабораторных животных.

При введении исследуемых культур бацилл белым крысам орально в дозе 3,0 мл, внутривенно в дозе 3,0 мл, внутрикожно в дозе 0,04 мл, в область стопы правой задней лапки в дозе 0,1 мл на протяжении всего периода наблюдений патологических изменений не выявлено. Область введения препаратов безболезненна, отека и покраснения не наблюдалось.

Подопытные животные хорошо переносили культуры, были клинически здоровы в течение всего эксперимента, не отмечалось отклонений в поведении, приеме корма и воды, аналогично животным контрольной группы. Изменений состояния шерстного покрова и двигательной активности у крыс опытных групп, по сравнению со сверстниками из контрольной группы, не выявлено.

На протяжении всего опыта животные во всех группах имели хорошую упитанность и удовлетворительное общее состояние. Фекальные массы подопытных животных в период наблюдения были оформленными.

При патологоанатомическом изучении внутренних органов животных и изменений в их структуре не выявлено. Внутренние органы

располагались анатомически правильно, жидкость в плевральной и брюшной полостях отсутствовала, цвет органов и тканей соответствовал норме. Просвет трахеи и бронхов свободен, ткань легких имела розовый цвет. Слизистая оболочка, выстилаящая желудок и кишечник после использования исследуемых штаммов, была без видимых изъязвлений и кровоизлияний, серо-розового цвета. Печень, поджелудочная железа, почки, сердце экспериментальных животных были в норме, как и у контрольных животных.

Таким образом, результаты исследований показали, что в условиях *in vitro* отобранные монокультуры бацилл (*Bacillus velezensis* 19, *Bacillus velezensis* 40, *Bacillus velezensis* K 9, *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus subtilis* 14, *Bacillus subtilis* 16) проявляют высокую антагонистическую активность, подавляют рост условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. На основании результатов вышеизложенных исследований считаем, что штаммы бацилл *Bacillus velezensis* 19, *Bacillus velezensis* 40, *Bacillus velezensis* K 9, *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus subtilis* 14, *Bacillus subtilis* 16, предоставленные сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси, являются непатогенными и безвредными для лабораторных животных, не обладают токсичностью, аллергенностью и токсигенными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л. Ф. Бакулина, Н. Г. Перминова, И. В. Тимофеев // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48-56.
2. Осипова, И. Г. Споровые пробиотики / И. Г. Осипова, Н. А. Михайлова, И. Б. Сорокулова, Е. А. Васильева, А. А. Гайдеров // Ж. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 113-119.
3. Темираев, Р. Б. Пробиотики и ферментные препараты в рационах цыплят / Р. Б. Темираев, Т. Т. Гаппоева // Ветеринария. – 2009. – № 4. – С.20-21.