**Гаранкина, Анна Юрьевна. Влияние производственных штаммов пробиотиков на биологические свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов : диссертация ... кандидата биологических наук : 06.02.02 / Гаранкина Анна Юрьевна; [Место защиты: Башкир. гос. аграр. ун-т].- Оренбург, 2013.- 118 с.: ил. РГБ ОД, 61 14-3/347**

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА российской**

**ФЕДЕРАЦИИ**

ФГБОУ ВІТО «Оренбургский государственный аграрный университет»



04201452554

ГАРАНКИНА АННА ЮРЬЕВНА

ВЛИЯНИЕ производственных штаммов пробиотиков на биологические свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

1. - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: заслуженный ветеринарный врач РФ,

доктор ветеринарных наук, профессор Жуков А.П.

**Оренбург - 2013**

ОГЛАВЛЕНИЕ

**ВВЕДЕНИЕ 5**

1. **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**
2. [Биологические свойства кишечной микрофлоры 9](#bookmark0)
3. Антагонистическая активность микроорганизмов в отношении условно-патогенных микроорганизмов, биопленкообразование
4. [Фармакологическая характеристика пробиотиков 23](#bookmark1)
5. [Биологические аспекты пробиотикотерапии 37](#bookmark2)
6. Практическая значимость применения пробиотиков в животноводстве
7. **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 47**
8. **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ** 60
9. Биологические свойства выделенных штаммов 60
10. Изучение биологических свойств пробиотических штаммов *Е. coli,*

бактерий рода *Bacillus, Lactobacillus*

1. Изучение регуляторного действия микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков, на антагонистическую активность и персистентные 64 характеристики микроорганизмов
2. Антагонистическая активность микроорганизмов, входящих в состав ветеринарных пробиотиков в отношении условно-патогенных 64 микроорганизмов
3. Антагонистическая активность стерильных фильтратов культуральной жидкости пробиотических штаммов бактерий рода 67 Baccillus в отношении условно-патогенных микроорганизмов
4. Взаимное влияние на факторы персистенции условно-патогенных микроорганизмов и бактерий рода *Lactobacillus,* входящих в состав 69 ветеринарных пробиотиков
5. Изучение влияния стерильных фильтратов культуральной жидкости пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* на факторы

персистенции условно-патогенных микроорганизмов 74

1. Регуляция способности условно-патогенных микроорганизмов к

77

биопленкообразованию

1. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* и *Е. coli* на способность к

77

биопленкообразованию условно-патогенных микроорганизмов

1. Влияние стерильных фильтратов культуральной жидкости пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* на способность к 81 биопленкообразованию условно-патогенных микроорганизмов

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ 84

[ВЫВОДЫ 95](#bookmark10)

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 96

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК 97

АЛА - антилизоцимная активность

АЛфА - антилактоферриновая активность

БАВ - биологически активные веществ

ВОЗ - всемирная организация здравоохранения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕД - единица действия

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

КРС - крупный рогатый скот

КОЕ - колониеобразующая единица

МП- миелопероксидаза

ОП - оптическая плотность

**ВВЕДЕНИЕ**

Актуальность темы. В настоящее время эффективное ведение животноводства и птицеводства просто немыслимо без применения пробиотиков. Предпосылкой являются уникальные качества этих препаратов, а именно способность одновременно интенсифицировать пищеварительные процессы, стимулировать неспецифическую резистентность - тем самым повышать продуктивные качества сельскохозяйственных животных и птиц (Лебедева И.А., 2008, Мирошников С.А., 2008, Ушакова Н.Ф., 2012).

Между тем, большая часть исследований посвящена определению эффективности воздействия пробиотиков на продуктивные качества сельскохозяйственных животных, при этом доля микробиологических экспериментов по данному направлению чрезвычайно мала. В данный момент пробиотики практически нефассматриваются как регуляторы антиоксидантного статуса макроорганизма, что, однако, не исключает их вероятную и эффективную роль в поддержании устойчивости организма к активным формам кислорода (Панин А.Н., Малик Н.И., 2006; Сидоренко О.Д., 2010).

Использование пробиотиков является одним из наиболее эффективных и физиологических путей профилактики и коррекции нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта, а также развивающихся вследствие этого вторичных расстройств не только пищеварительной, но и иммунной, эндокринной систем (Смирнова Т.А., 2010).

Для коррекции дисбиотических состояний наиболее рационально и физиологически обосновано использование пробиотиков - живых микробных культур, входящих в состав пищевых добавок. Изучение условий регулирующего воздействия на персистентные свойства микроорганизмов открывает возможности для поиска эффективных методов терапии и профилактики заболеваний (Stanton Т.В., 2013).

Часто возникает проблема постепенного снижения уровня антагонистической активности для препаратов, выпускаемых на основе давно известных производственных штаммов, что в конечном итоге отражается на

лечебно - профилактической эффективности пробиотика. Таким образом, необходимо изучение антагонистической активности подобных штаммов (Давыдов Д.С., 2007).

В последние годы отмечается возрастающая роль условно-патогенных микроорганизмов в возникновении острых кишечных инфекций. Однако факт выделения указанных микроорганизмов не всегда свидетельствует об их этиологической значимости при данных заболеваниях. В итоге эффективность препарата снижается, что вызывает нарекания со стороны специалистов. В связи с этим, актуальным и интересным является исследование, направленное на изучение регуляции пробиотиками персистентных характеристик патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. (Алешкин В.А., Тихонова

Н.Т., 2002).

**Целью** работы явилось исследование антагонистической активности штаммов, входящих в состав пробиотиков, и их влияние на биологические свойства патогенных и условно - патогенных микроорганизмов.

Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи:**

* изучить антагонистическую активность микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков, в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов;
* определить влияние микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков на биологические свойства (персистентные характеристики) патогенных и условно - патогенных микроорганизмов;
* установить влияние микроорганизмов на способность патогенных и условно - патогенных микроорганизмов к биопленкообразованию.

**Область исследования.** Исследование проведено в рамках специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология,

эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, паспорта специальности ВАК РФ (биологические науки).

**Научная новизна.** Установлено, что различные пробиотики по разному влияют на персистентные признаки и способности к биопленкообразованию условно-патогенной микрофлоры, что необходимо учитывать при отборе штаммов лактобацилл при создании новых биопрепаратов. Установлено, что наиболее эффективным среди выбранных биопрепаратов оказался Лактоамиловорин, снижающий антилактоферриновую и антилизоцимную активности у большинства изученных видов микроорганизмов.

**Теоретическая и практическая значимость** работы заключается в расширении представлений о влиянии производственных штаммов пробиотических микроорганизмов на биологические свойства патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Полученные данные могут представлять интерес с точки зрения формирования колонизационного потенциала пробиотиков, поскольку известно, что штаммы микроорганизмов с высокими показателями персистентных признаков переживают в организме более длительное время. Полученные данные могут быть использованы в практике ветеринарного врача при коррекции дисбиотических нарушений с использование эффективных пробиотиков, отобранных под контролем биологических характеристик.

**Реализация результатов исследования.** Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе и проведении научно- исследовательской работы в Оренбургском, Саратовском ГАУ, Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина, Самарской, Ижевской, Вятской ГСХА, в ГАУ Северного Зауралья, в Рязанском агротехнологическом университете им. П.А. Костычева, Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертационной работы доложены, обсуждены, одобрены и опубликованы в трудах итоговых научных конференций: VII международной научно-практической конференции «Наука. Теория и практика-2011» (Варшава, 2011); 1-й международной научно- практической Интернет-конференции (г. Ставрополь, 2011), Международной научно-практической Интернет- конференции (Ставрополь, 2012).

**Публикации результатов исследований.** Основные положения диссертации изложены в четырех научных работах, в том числе две публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. В изучении антагонистической активности метод прямого антагонизма имеет качественные преимущества при оценке антагонистической активности *Lactobacillus* в отношении условно-патогенных микроорганизмов.
2. Различные пробиотики не одинаково влияют на персистентные признаки условно-патогенной микрофлоры, что необходимо учитывать при отборе штаммов лактобацилл для создания биопрепаратов.
3. Пробиотические штаммы бактерий рода *Lactobacillus* разнонаправленно влияют на способность к биопленкообразованию условно-патогенных микроорганизмов.

**Объём и структура диссертации.** Работа изложена на 118 страницах печатного текста; включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические рекомендации, библиографический список. Работа иллюстрирована 11 рисунками и 11 таблицами. Библиографический список включает 219 источников, в том числе - 74 иностранных автора.

выводы

1. Метод прямого антагонизма имеет качественные преимущества при оценке антагонистической активности *Lactobacillus sp.* в отношении условно- патогенных микроорганизмов по сравнению с методом отсроченного антагонизма. Пробиотические штаммы *Е. coli* антагонистически активны в отношении условно-патогенных микроорганизмов *Е. coli*,также *L. Acidophilus* проявляет большую антагонистическую активность в сравнении с L. *Amylovorus* и максимальная антагонистическая активность пробиотических *Lactobacillus sp.* отмечена в отношении бактерий рода *Staphylococuccus sp.,* а среди пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* - штамм, выделенный из препарата Споровит в отношении грибов *С. albicans.*
2. Установлено, что различные пробиотики по-разному влияют на персистентные признаки условно-патогенной микрофлоры, что необходимо учитывать при отборе штаммов лактобацилл для создания биопрепаратов. При этом наиболее эффективным среди выбранных биопрепаратов оказался Лактоамиловорин, снижающий АЛфА и АЛА у большинства изученных видов микроорганизмов; также снижают АЛА стерильные фильтраты культуральной жидкости пробиотических штаммов *В. cereus* из препарата Бактисубтил у бактерий рода *Klebsiella* и грибов *С. albicans.*
3. Пробиотические штаммы бактерий рода *Lactobacillus* разнонаправлено влияют на способность к биопленкообразованию условно- патогенных микроорганизмов; экзометаболиты пробиотических штаммов Е. coli вызывают снижение способности к биопленкообразованию у бактерий родов *Klebsiella* и *Staphylococuccus,* также препарат Бакстисубтил снижал способность к биопленкообразованию.

**Практические рекомендации**

1. Лактоамиловорин, Лактоферон, Лактобифадол могут быть использованы для лечения и профилактики в ветеринарии и медицине инфекционно­воспалительных заболеваний, санации бактерионосителей, коррекции дисбиозов различной этиологии, так как штаммы, входящие в состав этих препаратов, сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени, устойчивы к условно-патогенным микроорганизмам.
2. Материал диссертационной работы, может быть рекомендован для использования:

- в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий на биологических, ветеринарных и микробиологических факультетах высших учебных заведений;

- при написании соответствующих разделов учебников, монографий, справочных руководств и пособий по ветеринарной микробиологии.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абляева Е.В. Регуляция факторов персистенции микроорганизмов споровых пробиотиков / Е.В. Абеляева, С.В. Абеляева, О.А. Капустина // Естествознание и гуманизм. - 2005. - Том 2. - №4. - С. 81.
2. Абляева Е.В. Влияние споровых пробиотиков на факторы персистенции микрорганизмов / Е.В. Абеляева, С.В. Абеляева, О.А. Капустина//Вестник ОГУ. - 2006. - №13.-С. 111.
3. Алешкин В.А. Новое направление бактериотерапии - комплексные пробиотики / В.А. Алешкин, Н.Т. Тихонова // Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования: Сб. мат. конф. - М.: 2002. - 47 с.
4. Аликин Ю.С. Ветеринарные препараты на основе БАВ - новый класс эффективных препаратов / Ю.С. Аликин, В.И. Масычева, В.П. Клименко // Новые фармакологические средства ветеринарии: материалы докл. 8-й межгос. межвуз. науч.-практ. конф. - СПб., 1996. - С. 37-38.
5. Аликин Ю.С. Перспективы разработки и применения препаратов нового поколения БАВ в качестве лечебных и профилактических средств при болезнях молодняка / Ю.С. Аликин, В.И. Масычева // Актуальные вопросы ветеринарии: тез. докл. 1-й науч.-практ. конф. фак. вет. мед. НГАУ. - Новосибирск, 1997.-С. 11-12.
6. Алиев И.М. Влияние добавок в корм биомассы слизистых бацилл на рост и развитие цыплят / И.М. Алиев // Клинико-биохимические исследования, профилактика и лечение незаразных болезней животных: сб. науч. тр. - Омск,
7. - С. 38-39.
8. Алиев М.А., Алмагамбетов К.Х., Бондаренко В.М. Моделирование транслокации кишечной микрофлоры на конвенциональных животных / М.А. Алиев и др. // Микробиология, эпидемиология и иммунология. -1991.— № 8.- С. 15-17.
9. Алямкин Ю. Пробиотики вместо антибиотиков - это реально / Ю.

**97**

Алямкин *II* Птицеводство. - 2005. - № 2. - С. 17-18.

1. Андреева И.В. Потенциальные возможности применения пробиотиков в клинической практике // Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. - 2006. - Т. 8. - № 2. - С. 151-172.
2. Антипов В.А. Использование пробиотиков в животноводстве / В.А. Антипов // Ветеринария. - 1991. - № 4. - С. 55-58.
3. Арбацкая М.Д. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М.Д. Арбацкая, А.В. Дубинин // Терапевтический архив. - 2001. - Т. 73. -№ 2. - С. 67-72.
4. Бала С.С. Антагонистическая активность пробиотиков на основе аэробных спорообразующих бактерий / С.С. Бала // Успехи современного естествознания,- 2004. - № 12. - С. 84-85.
5. Башкирова О.П. Выращивание птицы без антибиотиков-2008. [Электронный ресурс]. URL: <http://vitaagro.narod.ru/noanty.html> (дата обращения 15.09.2010).
6. Белявская В.А. Пробиотики из рекомбенантных бацилл - новый класс лечебно-профилактических препаратов и способ доставки лекарственных белков в организм // Сб. тр. сотр. НИКТИ БАВ. - Бердск,- 1996. - С. 195-196.
7. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер // Медицина.- М.: 1982.- с. 229.
8. Бовкун Г. Роль бифидогенных факторов в профилактике и терапии дисбактериозов / Г. Бовкун и др. // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2008. -№ 10. - С. 51-55.
9. Бондаренко В.М. Механизм действия пробиотических препаратов /В.М. Бондаренко и др. // БИО препараты. - 2003. - № 3. - С. 2-5.
10. Белов А.Д. Изучение коррекционного воздействия лактобактерий на биоценоз кишечника при диареях новорожденных телят / А.Д. Белов, Е.С. Воронин- М.: Мир, 1991.-С. 9-10.
11. Белоусова Е.А. Возможности препаратов на основе микробных метаболитов для восстановления кишечной микробиоты / Е.А. Белоусова и др.

// Consilium medicum.- 2005. - Выпуск № 1. - С. 9-13.

1. Беркольд Ю.И. Влияние пробиотических препаратов на основе Bacillus subtilis на физиологические показатели роста цыплят-бройлеров / Ю.И. Беркольд, А.Б. Иванова // Сиб. вестн. с.-х. науки. - 2006.- № 4. - С. 45^-8.
2. Бессарабов Б.Ф. Уровень естественной резистентности птиц при различных кормовых добавках / Б.Ф. Бессарабов, Г.М. Урюпина // Повышение естественной резистентности сельскохозяйственной птицы: сб. науч. тр. Моск. вет. Академия. -.М.: 1983. - С. 3-6.
3. Бессарабов Б.Ф. Методы контроля и профилактики незаразных болезней птиц / Б.Ф. Бессарабов, Л.М. Обухов, И.Л. Шпильман. - М.: Росагропромиздат,1988. - 253 с.
4. Болотников И.А. Практическая иммунология сельскохозяйственной птицы / И.А. Болотников, Ю.В. Конопатов.- СПб: Наука, - 1993. - 208 с.
5. Бондаренко В.М. Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта / В.М. Бондаренко, Б.Б. Боев, Е.А. Нонкова // Русский медицинский журнал: РМЖ. - 1998,- № 1.\_ С. 66-70.
6. Бондаренко В.М., Пробиотики, пребиотики и синбиотики / В.М. Бондаренко,Н.М. Грачева // Фарматека. - 2003. -№ 7. - С. 56-63.
7. Бондаренко В.М., Микроэкологические изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева, Т.В. Мацулевич, А.А. Воробьев // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии - 2003.-№ 20 — С. 66-76.
8. Бондаренко В.М. Механизм действия пробиотических препаратов /

В.М. Бондаренко, Р.П. Чупринина, М.А. Воробьева // БИО препараты - 2003. - №3.-С. 2-5.

1. Бондаренко В.М. О совершенствовании пробиотических препаратов // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты. Науч.-практ. Журн. - 2007. - № 12. -24 с.
2. Борисенкова А. Контроль бактериальных болезней птицы // Животноводство России, декабрь, 2007. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.webpticeprom.ru/ru/articles-veterinary.html?pageID=l> 199862408 (дата обращения 5.10.2010).
3. Бухарин О.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине / О.В. Бухарин, Н.В. Васильев. - Томск: ТГУ, 1974. - 208 с.
4. Бухарин, О.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при взаимодействии /О.В. Бухарин, А.В. Семенов,

С.В. Черкасов //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия- 2010. -№4.~ С. 347-352.

1. Вечеркин А.С. Нерациональное использование антибиотиков в животноводстве / А.С. Вечеркин // Ветеринария. - 2004- № 9. - С. 7-8.

33. Герасименко, В.В. Влияние штамма *E.coli S5/98,* входящего в состав пробиотика Микроцикол, на антилизоцимную активность энтеробактерий / В.В. Герасименко, В.Н. Никулин, А.Г. Гудков, О.Л. Карташова, Б.В. Тараканов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2006 - Т.

1. -№ 9-1- С. 98-100.

34. Грачева Н.М. Микробная экология и состояние слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у больных аллергическими заболеваниями / Н.М. Грачева, Н.А. Колганова, И.Т. Щербаков // Журнал микробиологии. - 2004. -№

1. -С. 79-81.

35. Давыдов Д.С. Мировое применение споровых пробиотиков в практике здравоохранения / Д.С. Давыдов и др. // Клиническое питание. - 2007. - № 2. - С. 3-38

1. Данилевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков / Н.В. Данилевская // Ветеринария. - 2005. - № 11. - С. 6-10.
2. Денисов Г. Обоснованность применения пробиотиков в промышленном птицеводстве. 2008. [Электронный ресурс]. URL: http//[www.webpticeprom.ru/ru/articlesveterinary.html?pagelD=123004512](http://www.webpticeprom.ru/ru/articlesveterinary.html?pagelD=123004512) (дата обращения 30.09.2010).
3. Дроздова Л.И., Берсенева Е.В. Морфологическое обоснование результативного применения пробиотика БИОСПОРИНА на цыплятах- бройлерах // Современные проблемы ветеринарной диетологии и нутрициологии. Матер. 4-го междунар. симпозиума. 6-8 мая 2008. - С. 62 -
4. Душкин В.А. Биологические особенности безмикробных животных Теоретические и практические основы гнотобиологии / В.А. Душкин // Сб. науч. тр. - М., 1983. - С. 4-45.
5. Егоров И. Пробиотик лактоамиловарин стимулирует рост цыплят / И. Егоров и др. // Птицеводство - 2004. - № 8 - С. 32-33.