

- ing the assembly of the head of the bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680-685.
9. Lee, L.F. Humoral immune responses to inactivated oil-emulsified Marek's disease vaccine/ L.F. Lee, R.L. Witter// *Avian diseases*. 1991. V.35. P.452-459.
10. Nazerian, K. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus/ K.Nazerian, L.F. Lee, N. Yanagida, R. Ogava// *Journal of Virology*. 1992. V.66. P.1409-1413.
11. Schat, K.A. Immune responses to Marek's disease virus infection/K.A. Schat, C.J. Markowski-Grimsrud// *Curr Top Microbiol. Immunol.* 2001. V.255. P. 91-120.
12. Silva, R.F. Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. R.F. Silva, L.F. Lee // *Virology*. 1984. V.136. P.307-320.
13. Tischer, B.K. DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens/ B.K. Tischer, D. Schumacher, M. Beer et al.// *Journal of General Virology*. 2002. V.22. P.2367-2376.
14. Tischer, B.K. High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth in vitro/ B.K. Tischer, D. Schumacher, D. Chabanne-Vautherot et al.// *Journal of Virology*. 2005. V. 79. P.5889-5899.
15. Zelnik, V. An Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial/ V.Zelnik, O. Harlin, F.Fehler et al.// *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 2004. V.51. P.61-67.

УДК 576.8:616-002.5

З.Г. Воробьева, М.А. Кульчицкая, К.Н. Силина, А.Л. Лазовская
*ГНУ Научно-исследовательский ветеринарный институт – НИВИ,
г. Нижний Новгород*

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МИКОБАКТЕРИЯМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Широко известна эффективность применения различных пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиозов у людей и животных, вызванных многими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на болезнетворные бактерии. Например, лизоцим резко снижает способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Бактериоцины обладают бактериостатическим действием на грамотрицательную и грамположительную флору. По силе воздействия на негативную кишечную микрофлору, а также на микрофлору влагалища препараты из живых бактерий могут быть альтернативой антибиотикам. Дополнительным механизмом, усиливающим защитные свойства пробиотиков, является обмен сигнальными молекулами с иммунокомпетентными клетками слизистых оболочек, стимулирующий продукцию секреторного иммуноглобулина А, комплемента, лизоцима и блокирующий прикрепление патогенных бактерий к поверхности слизистой (1,3,4).

В ветеринарии назрела необходимость применения пробиотиков с антагонистическими свойствами против микобактерий туберкулеза в связи с тем, что молодняк скота обычно заражается туберкулезом алиментарным путем в первые дни жизни.

В литературе хорошо освещены различные методы изучения антагонистического действия пробиотиков на различные бактериальные патогены. Чаще всего культуры засевают на чашки Петри с питательным агаром перпендикулярными штрихами или перекрещивающимися каплями. Существенно отличаются и критерии оценки полученных результатов, но чаще всего о степени антагонистической активности бактерий судят по величине зоны задержки роста индикаторных микробов. Значительно реже оценивается количество индикаторных бактерий (КОЕ), на которое представители пробиотиков оказывают ингибирующее действие. Поэтому данные, получаемые различными авторами при изучении микробного антагонизма не всегда однозначны (2).

Трудность изучения антагонизма пробиотиков и патогенных микобактерий заключается в особенностях биологии этих видов: очень медленный рост и особые требования к средам затрудняют их одновременное выращивание.

Целью данного исследования явилась разработка различных способов изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» по отношению к микобактериям различных видов.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы микроорганизмов, полученные из ГИСК им.Л.А.Тарасевича (г.Москва): *M.tuberculosis* (шт.Академия), *M.bovis* (шт. Vallee, Ravenal, BCG), *M.avium* (шт.ГИСК), *M.phlei* (1). Пробиотик «Окарин» выпускает фирма ИмБио (г.Нижний Новгород) филиал фирмы «Микроген» (г.Москва) в лиофилизированной форме. В состав пробиотика «Окарин» входят три штамма *Escherichia coli* (Г-35-1/59, Г-35-2/60, Г-35-3/61) и один штамм *Enterococcus faecalis* (Г – 35- 4/62).

Леофилизированный пробиотик для работы разводят в изотоническом растворе хлорида натрия так, чтобы в 1мл содержалось $5 \pm 2 \times 10^7$ КОЕ.

Микобактерии культивировали на плотных яичных средах Левенштейна-Иенсена и Финн-2. Инкубирование пробиотика, микобактерий и смеси пробиотика с микобактериями проводили на среде Сотона. Разведение культур микобактерий в изотоническом растворе хлорида натрия проводили так, чтобы в контроле при посеве 10мкл суспензии микроорганизмов на плотную среду вырастало от 20 до 40 колоний. Эти разведения отработывали для каждого штамма отдельно.

Фильтраты культуральных жидкостей готовили с помощью стерилизующих фильтров типа GSO 0,22мкм для шприцов с предварительным центрифугированием при 4000 об/мин. Гретье фильтраты и гретую суспензию пробиотика «Окарин» получали прогреванием пробирок с культуральными жидкостями на водяной бане при 100° С в течение 5-10 минут.

Опыты по изучению бактерицидной активности фильтратов проводили следующим образом:

1 серия – засевали суспензию микобактерий в объеме 10мкл, содержащую взвесь с концентрацией приблизительно 500 млрд. клеток в 1 мл с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания

2 серия – засевали суспензию пробиотика в объеме 10 мкл, содержащую

$5-10 \times 10^7$ КОЕ в 1мл с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания (серия 2а – негретый фильтрат, серия 2б – гретый фильтрат)

3 серия – засевали суспензию пробиотика в объеме 10 мкл, содержащую

$5-10 \times 10^7$ КОЕ в 1мл и через 6 суток выращивания при 37°С прогревали при 100°С на водяной бане в течение 5-10 минут.

4 серия – засевали суспензию пробиотиков и микобактерий (отдельно для 4 видов: а, б, в, г) в тех же объемах соответственно с последующим фильтрованием через 6 суток выращивания.

Измеряли pH культуральных фильтратов. Наслаивали фильтраты и гретую суспензию пробиотика на плотные питательные яичные среды в количестве 1мл и выдерживали в термостате при 37°С до полного всасывания в среду. После всасывания фильтратов и суспензии проводили посевы микобактерий пяти видов на 3 пробирки с плотной средой и культивировали до 40 дней при 37°С.

Во всех опытах проводили контрольные посевы для сравнительного подсчета колоний на средах с культуральными фильтратами и без них. Опыты считали правильно поставленными, если количество микроорганизмов в контрольных посевах колебалось от 20 до 40 колоний и было легко считаемым. После подсчета колоний в контроле и в опыте вычисляли индекс блокирования роста (ИБР): $ИБР = K_1/K_2$, где K_1 – количество колоний в контроле, K_2 – количество колоний в опыте.

Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Результаты и обсуждение. Посевы микобактерий в среду Сотона не выявили их роста в течение 10 суток инкубации. Посевы пробиотика «Окарин» на среду Сотона дали через 2 суток достаточно хороший рост, сопоставимый по плотности с посевом на мясо-пептонный бульон.

Измерение pH фильтратов показало незначительные колебания от 6,9 до 7,2, что не могло отразиться на росте микобактерий. В опытах по изучению воздействия культуральных фильтратов (четыре серии) на рост микобактерий (табл.) были получены следующие результаты: культуральные фильтраты серии 1 не оказывали действия на скорость роста и количество колоний микобактерий при выращивании их на двух питательных средах.

Фильтраты серии 2 (гретые и негретые) снижали число колоний микобактерий в 2,4 – 3,6 раза. Гретая суспензия пробиотика «Окарин» (серия 3) оказывала такое же действие на микобактерии как и его фильтраты, снижая число колоний микобактерий в 2,4 раза . Фильтраты серии 4 (совместное инкубирование пробиотика и микобак-

**Индекс блокирования роста (ИБР) препарата «Окарин»
по отношению к штаммам патогенных микобактерий**

№ серии опытов	Варианты опыта	Штаммы					Среднее значение ИБР
		M.avium (ГИСК)	M.tuberc. (Академия)	M.bovis (Vallee)	M.bovis (Ravenal)	M.bovis (BCG)	
1	Фильтрат суспензии микобактерий	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2а	Фильтрат пробиотика негретый	3,2	2,0	1,3	4,6	1,0	2,42
2б	Фильтрат пробиотика гретый	5,0	1,0	4,0	1,48	6,0	3,67
3	Суспензия пробиотика гретая	1,4	2,6	1,0	1,0	6,0	2,4
4а	Фильтрат пробиотика с M.bovis(BCG)	15,8	5,5	5,1	5,5	7,1	7,8
4б	Фильтрат пробиотика с M.tuberc/(Acad.)	10,0	3,1	5,1	6,5	5,36	6,07
4в	Фильтрат пробиотика с M/avium (ГИСК)	8,5	5,2	1,7	12,75	10,0	7,62
4г	Фильтрат пробиотика с M.phlei (№1)	14,0	5,3	9,6	-	-	9,6

Примечание: - – исследование не проводили

терий четырех видов) существенно влияли на количество выросших колоний микобактерий, снижая их число в 6-9 раз.

Отмечено также бактериостатическое действие фильтратов (серия 4) : появление колоний в присутствии таких препаратов отставало на 2-10 дней по сравнению с контролем. Исследование влияния срока хранения культуральных фильтратов при 4°С выявило их активность в течение 1 года хранения (срок наблюдения).

Таким образом, в результате проведения опытов разработаны два способа изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» по отношению к четырем видам микобактерий. Наиболее перспективным оказался способ, основанный на совместном инкубировании пробиотика и микобактерий с последующим получением стерильного фильтрата и изучения его действия на рост колоний микобактерий. Повидимому совместное инкубирование пробиотика «Окарин» и микобактерий стимулирует выработку пробиотиком бактериоцинов, угнетающе влияющих на рост культур микобактерий.

Особый интерес представляют собой фильтраты, полученные при совместном инкубировании пробиотика и M.phlei. Это

сапрофитный вид микобактерий, достаточно далекий по таксономии от туберкулезных микобактерий, однако фильтрат, полученный после совместного инкубирования с пробиотиком так же активен, как и фильтраты, полученные после инкубирования пробиотика с туберкулезными микобактериями.

Выводы.

1. Разработаны способы изучения антагонистического воздействия пробиотика «Окарин» на патогенные микобактерии с использованием стерильных культуральных фильтратов, полученных в результате выращивания пробиотика и пробиотика с микобактериями разных видов.

2. Фильтраты, полученные после выращивания пробиотика «Окарин» на среде Сотона (гретые и негретые) оказывают умеренное влияние на рост микобактерий, снижая КОЕ в 2-3 раза.

3. Пробиотик «Окарин» в жидкой синтетической среде Сотона в присутствии микобактерий вырабатывает бактерицидные вещества, оказывающие бактериостатическое и бактерицидное действие на рост патогенных микобактерий и снижающее КОЕ микобактерий при выращивании на плотных питательных средах в 6-9 раз.

РЕЗЮМЕ

Разработаны способы изучения антагонистической активности пробиотика «Окарин» на патогенные микобактерии с использованием стерильных культуральных фильтратов, полученных в результате выращивания пробиотика или пробиотика с микобактериями в жидкой среде Сотона. В присутствии микобактерий пробиотик вырабатывает активные бактериоцины, снижающие КОЕ микобактерий при выращивании на плотных средах в 6-9 раз.

Литература

1. Данилевская Н.В. Фармакологические аспекты применения пробиотиков.// Ветеринария, 2005, №11, с. 6-10
2. Ермоленко Е.И., Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Гец В.В. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл.// ж.Микробиология, 2004, №5, с.94-98
3. Панин А.Н., Малик Н.И. Пробиотики – неотъемлемый компонент рационального кормления животных.// Ветеринария, 2006, №7, с. 3-6.
4. Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Рахимова Н.Г. К механизму антагонистической активности лактобацилл // ж.Микробиология, 1989, №2, с. 3-8.

УДК: 636.22/28:612/574 (470.55)

Е.Н. Воронина

ФГОУ ВПО Уральская государственная академия ветеринарной медицины

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ОРГАНИЗМА И ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ У ТЕЛЯТ В БИОГЕОХИМИЧЕСКОЙ ПРОВИНЦИИ ЮЖНОГО УРАЛА

Зона Южного Урала относится к числу неблагоприятных регионов, так как на ее территории имеется большое количество биогеохимических провинций. (А.А. Кабыш, 1967, 2006, Г.П. Грибовский, 1996, Т.А. Шепелева, 1998 и др).

На территории Челябинской области химический состав питьевой воды, почв и произрастающих на ней растений чрезвычайно разнообразен. Здесь обнаруживаются районы с повышенным или пониженным содержанием тех или иных химических элементов. Например, Октябрьский район характеризуется недостатком Со, Мп, Си и избытком В, Ni, Fe, Красноармейский район – недостатком Со, Мп, S и избытком Fe, F, Cu, B, Si, Ti, Брединский, Карталинский и Варненский районы – недостатком Со, Мп, I и избытком Mg, Ni, Sr, Ва и другие.

Данное обстоятельство вызывает различную биологическую реакцию организма, особенно растущего (приспособление, эндемические заболевания, уродства и гибель). Так, в ГУ ОПСП «Троицкое» Челябинской области, являющееся, на сегодняшний день, самым крупным сельскохозяйственным предприятием, занимающимся разведением и выращиванием крупного рогатого скота, наблюдали различные отклонения в развитии животных: телята часто рождались слабыми, при хорошем содержании и кормлении у животных снижалась продуктивность. Кроме того, у телят наблюдалась низкая сопротив-

ляемость к различным негативным факторам внешней среды (перепады температуры, высокая влажность), в результате чего у животных возникали простудные заболевания, которые часто проходили с рецидивами и гибелью.

Поэтому одной из задач нашей работы было выяснение влияния экологических факторов на физиологические функции организма, деятельность функциональных систем клинически здоровых (условно) телят в условиях ГУ ОПСП «Троицкое» Челябинской области - геохимической провинции Южного Урала. Для этого, нами были проведены клинические обследования телят, лабораторные исследования кормов, воды, молока, используемого для выпаивания телятам, и крови.

При общем обследовании телят в возрасте до 4 месяцев было установлено, что примерно у 25-30% животных наблюдалась задержка формирования скелета и мышечной ткани, ригидность мышц, повышенная возбудимость, анемичность, сухость и складчатость кожи, бледность слизистых оболочек, нарушения в развитии шерстного покрова (огрубение, плохое удержание волоса в волосяных луковицах, его тусклость, ломкость, взерошенность, алопеции, утолщение эпидермиса (рис. 1, 2).

При клиническом осмотре молодняка были выявлены различные нарушения функций желудочно-кишечного тракта почти у всех обследуемых животных (ги-