

**ВЛИЯНИЕ *AEROCOCCUS VIRIDANS* ШТАММ *BI-07* НА САЛЬМОНЕЛЛЕЗ У БЕЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ СИМУЛЬТАННОМ ПРИМЕНЕНИИ АНТАГОНИСТОВ**

**И.А. Бибен**, к.вет.н., доцент, Днепропетровский государственный агроэкономический университет

Одним из приоритетных направлений ветеринарной медицины на современном этапе является создание гуманных и экологически чистых технологий содержания животных, с целью получения биобезопасной и физиологически качественной продукции животноводства. Устаревшим и экологически неприемлимым является использование кормовых антибиотиков для сохранения молодняка и в качестве стимуляторов роста. Безусловной альтернативой кормовым антибиотикам являются пробиотические препараты из резидентной микрофлоры.

Активными антагонистическими свойствами по отношению к кишечным бактериальным патогенам обладает *Aerococcus viridans*. Антимикробная активность аэрококков обеспечивается продукцией перекиси водорода и комплексным стимулирующим воздействием на иммунореактивность макроорганизма. В нашей работе мы изолировали из здорового организма культуру аэрококков и изучили ее влияние на инфекционный процесс при сальмонеллезе белых мышей в качестве терапевтического и профилактического средства. При этом установили, что при сальмонеллезе, эмерджентной инфекции для белых мышей, культура аэрококков оказывает слабовыраженное терапевтическое воздействие, однако при предварительной и перманентной даче оказывает эффективное противодействие развитию сальмонеллезной инфекции у белых мышей.

**Ключевые слова:** *Aerococcus viridans* штамм *BI-07*, белые мыши, сальмонеллез, микробный антагонизм, профилактика кишечных инфекций.

**Постановка проблемы.** *Aerococcus viridans* – представитель резидентной микрофлоры организма животных и человека, обитает в респираторном и кишечном тракте, на коже и в репродуктивных органах, выделяется из окружающей среды. Из литературных данных известно, что аэрококки обладают широким спектром ферментативной активности и проявляют выраженные антагонистические свойства к некоторым патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [1, 4, 9, 12-14]. Антимикробная активность аэрококков связана с продукцией в окружающую среду перекиси водорода, которая образуется при окислении молочной кислоты, пировиноградной кислоты и глицерофосфата, при этом повреждается клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана микробных мишеней. Кроме морфологических нарушений аэрококки вызывают нарушение роста тест-культуры. Собственная антиоксидантная защита аэрококков обеспечивается супероксиддисмутазой, кофактором которой является марганец [2, 5-8, 10-12].

В гуманной медицине показана терапевтическая эффективность бактериальной культуры *Aerococcus viridans* при инфекциях вызванных сальмонеллами, микоплазмами, синегнойной палочкой, стафилококками и микобактериями [8, 9, 13, 14]. Установили, что аэрококки содержат ферменты, обеспечивающие антиоксидантную и антитоксическую защиту, ингибиторы протеолитических ферментов, фермент – лактат-оксидазу, окисляющую D- и L-изомеры молочной кислоты [6, 7, 9, 12].

При пероральном применении культура аэрококков, продуцируя перекись водорода, положительно влияет на неспецифические имму-

нобиологические факторы резистентности – способствует перестройке лимфоидного аппарата, вызывая стимуляцию неспецифических и специфических механизмов иммунопоэза посредством активации фагоцитарной функции поли- и мононуклеаров, усиливает синтез иммуноглобулинов плазматическими клетками, увеличивает число межэпителиальных лимфоцитов субэпителиальной лимфоидной ткани [2-8, 12, 14].

В ветеринарной медицине изучение биологических свойств культуры *Aerococcus viridans* только начинается и еще не изучено антагонистическое влияние аэрококков на патогенную и условно-патогенную микрофлору кишечника, что является чрезвычайно актуальным при выращивании молодняка в первые недели жизни, особенно в птицеводстве, где для борьбы с бактериальными возбудителями, индуцирующими абдоминальные расстройства и гибель молодняка, массово применяют антибиотики [6-9].

Цель исследования: изучить антагонистическую активность *Aerococcus viridans* штамм *BI-07* на сальмонеллезную инфекцию на модели белые мыши.

**Материалы и методы исследований.** Морфо-тинкториальные исследования бактериальных культур проводили по официальным общепотребительным методикам.

Для выделения аэрококков из фекалий мышей на поверхность МПА производили посев испражнений из разведения  $10^{-5}$ - $10^{-6}$ , инкубировали при 37,5 °С в течение суток и опылили посева тест-культурой *Vibrio* NAgp-6078. После повторной суточной инкубации отбирали колонии окруженные зоной отсутствия роста вибриона [Горбунова М.Л., 1969]. Испражнения отбирали в

предварительно взвешенные пробирки и после повторного взвешивания устанавливали вес пробы с последующим добавлением такого количества изотонического раствора хлористого натрия, чтобы получить разведение  $10^{-1}$  и далее, путем последовательных десятикратных разведений из основного раствора готовили разведения  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$ . Идентификацию изолированных культур аэрококков проводили по методу [Evans J.B., 1986]. Использовали также дополнительные тесты распознавания – характерную морфологию микроорганизмов при микроскопии, гемолиз на кровяном агаре, антагонизм в отношении тест-микробов на МПА.

Возбудитель сальмонеллеза *Salmonella typhimurium* культивировали в простых средах, количественное значение вирулентности определяли у суточных культур в S-форме по методу Спирмена-Кербера в модификации Ашмарина на беспородных белых мышах живой массой 18-20 г при подкожном заражении. Количество сальмонелл в заражающей дозе устанавливали посевом последовательных десятикратных разведений маточной суспензии на МПА с последующим подсчетом колоний и перерасчетом исходного накопления бактерий в живых микробных клетках (ж.м.к.).

#### Результаты собственных исследований.

Бактериологические исследования выполнены в НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского ГАЭУ.

На первоначальном этапе нашей работы культуру аэрококков применяли симультанно с эмерджентным бактериальным инфектопатогеном (сальмонеллами), то есть в качестве лечебного средства неспецифического, общеукрепляющего действия, при воздействии летального фактора микробного характера. Для этого выбрали 5 опытных групп беспородных нелинейных белых мышей обоего пола в возрасте 7-9 недель, живой массой 16-18 г, по 30 голов в каждой и с помощью зонда задали внутрь культуру аэрококков в возрастающих дозах – 1, 2, 3, 4, 5

млрд. ж.м.к. на голову, соответственно в 1, 2, 3, 4, 5 опытных группах. Одновременно мышей через зонд заразили взвесью на изотоническом растворе культурой сальмонелл в объеме одной  $LD_{50}$ , что по нашим предварительным расчетам составило 2,5 млрд. ж.м.к. В последующие 10 суток эксперимента мышам ежедневно задавали внутрь первоначальную лечебную дозу культуры аэрококка. Мыши в контроле получали физраствор. Тестами, подтверждающими специфичность ибеля мышей от сальмонеллезного сепсиса служили: изменения внутренних органов (увеличение, гиперемия, участки некроза); обнаружение типичных грамтрицательных палочек в мазках-отпечатках из органов; выделение исходной чистой культуры сальмонелл при посеве крови из сердца на висмут-сульфитный агар.

О лечебном эффекте культуры аэрококков при сальмонеллезной инфекции судили по двум критериям – выживаемости зараженных мышей в сравнении с контрольными и количеству высеваемых сальмонелл из фекалий мышей в динамике (на 2, 4, 6, 8, 10 сутки).

Получили следующие показатели выживаемости по группам: №1 –  $66,1 \pm 7,6$  %; №2 –  $61,4 \pm 8,2$  %; №3 –  $63,6 \pm 8,2$  %; №4 –  $62,8 \pm 8,3$  %; №5 –  $68,4 \pm 8,4$  %; контроль –  $53,4 \pm 9,2$  %. При этом расчетные различия исходных доз между опытными группами статистически не достоверны -  $P \geq 0,05$ . Количественные показатели выживаемости свидетельствуют о том, что культура аэрококков в возрастающих дозах не оказывает статистически существенного лечебного влияния на развитие сальмонеллезной инфекции на биомодели – белые мыши. Однако клинические наблюдения позволили констатировать более легкое и доброкачественное течение сальмонеллеза у опытных мышей, по сравнению с контрольными.

Количественная нагрузка сальмонелл в фекалиях в динамике патогенеза инфекционной патологии в зависимости от терапевтического эффекта культуры аэрококков представлена в таблице 1.

Таблица 1

#### Количество сальмонелл в фекалиях белых мышей (КОЕ/г; n=30)

Группы мышей	Сроки высева (сутки)				
	2	4	6	8	10
№1	$(4,2 \pm 0,4) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^5$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^5$	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^4$
№2	$(4,4 \pm 0,6) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^5$	$(0,3 \pm 0,1) \times 10^4$
№3	$(5,2 \pm 0,5) \times 10^5$	$(1,8 \pm 0,3) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,3) \times 10^5$	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^4$
№4	$(4,8 \pm 0,4) \times 10^5$	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(0,9 \pm 0,3) \times 10^4$
№5	$(4,9 \pm 0,3) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^6$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^4$
К	$(1,2 \pm 0,6) \times 10^6$	$(1,8 \pm 0,8) \times 10^6$	$(2,3 \pm 0,7) \times 10^6$	$(1,8 \pm 0,4) \times 10^6$	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^6$

Исходя из вышеизложенного, можно констатировать, что аэрококки, введенные в организм мышей совместно с сальмонеллами, в острый период смертельной инфекции не оказали выраженного защитного действия в отношении жизни зараженных животных, то есть не предот-

вратили заражение и не оказали бактерицидного эффекта на возбудитель *in vivo*, но пробиотик стимулировал иммунобиологическую активность неспецифической резистентности, что повысило эффективность процессов санации и самоочищения организма мышей от сальмонелл и спо-

собствовало выживанию мышей в более поздние сроки сальмонеллезной инфекции.

Учитывая слабый антимикробный эффект аэрококка в случае симультанного применения с летальным бактопатогеном, изучили профилактические потенции пробиотика, при незначительном во времени опережении превентивной дачи зубиотического препарата перед экспериментальным заражением смертельной инфекцией.

Методом бесповторной случайной выборки подобрали две рандомизированные группы белых мышей живой массой 16-18 г, опытную и контрольную, по 50 голов в каждой.

Изучаемую культуру аэрококка с профилактической целью вводили белым мышам внутрь в течение 7 суток в объеме 1,0 см<sup>3</sup> питательного бульона с накоплением 3,0 млрд. ж.м.к., затем заразили перорально культурой сальмонелл в объеме LD<sub>50</sub>. За животными наблюдали в течение 10 суток. Через 10 суток после заражения в опытной группе выжило 64,6±5,2 %, а в контрольной – 52,4±5,3 % при P≤0,01.

Полученные экспериментальные данные по выживаемости мышей при симультанной и превентивной даче аэрококков, позволяют предполагать, что аэрококки способны оказывать не столько лечебное воздействие при острой смертельной инфекции, так как не оказывали выраженного протективного эффекта и не защищали мышей от гибели против предварительно оттитрованной смертельной дозы возбудителя, сколько неспецифически-профилактическое, и способствовали выживаемости мышей в постинфекционный период.

На основании проведенных экспериментов по симультанной и превентивной даче аэрококков было решено изучить влияние пробиотической культуры на инфекционный процесс при введении культуры *Aerococcusviridans* штамм *BI-07* до и после заражения, то есть предварительно заселить общую экологическую нишу обитания конкурирующей с сальмонеллам микроорганизмами – аэрококками. Проведи третью серию экспериментов, где постоянно задавали культуру аэрококков опытной группе мышей, до заражения сальмонеллами и первые 10 суток течения инфекционного процесса.

Для этого эксперимента сформировали две

рандомизированные группы белых мышей живой массой 16-18 г, опытную и контрольную, по 50 голов в каждой.

Изучаемую культуру *Aerococcusviridans* штамм *BI-07* с профилактической целью вводили белым мышам внутрь в течение 7 суток в объеме 1,0 см<sup>3</sup> питательного бульона с накоплением 3,0 млрд. ж.м.к., затем заразили перорально культурой сальмонелл в объеме LD<sub>50</sub>. За животными наблюдали в течение 10 суток. Все это время продолжали задавать внутрь опытным мышам однократно в сутки по 1,0 см<sup>3</sup> питательного бульона с содержанием 3,0 млрд. ж.м.к. аэрококков. Через 10 суток после заражения в опытной группе выжило 74,6±5,2 %, а в контрольной – 53,4±5,4 % при P≤0,01.

Сравнение результатов трех различных схем пероральной дачи культуры аэрококков, дает возможность с уверенностью утверждать о несомненной пользе постоянного скармливания культуры аэрококка в ситуации экспериментальной острой эмерджентной сальмонеллезной инфекции. Культура аэрококка способна приживаться в кишечнике мышей и проявляет антагонистические свойства, как представитель резидентной микрофлоры, в отношении транзитной патогенной микробиоты.

**Выводы.** 1. Культура *Aerococcusviridans* штамм *BI-07* при оральном применении симультанно с сальмонеллами оказывает санирующее воздействие на организм белых мышей в отношении эмерджентного бактопатогена и приводит к освобождению опытных животных от возбудителя, при этом несмотря на отсутствие статистически значимого протективного эффекта против летального действия заражающей дозы бакинфекта, культура пробиотика способствовала выживанию мышей в постинфекционный период острого опыта.

2. Перманентное пероральное введение культуры *Aerococcusviridans* штамм *BI-07* значительно повышает выживаемость белых мышей при острой летальной сальмонеллезной инфекции, что позволяет применять культуру пробиотика с профилактической целью, для предупреждения развития диарейного синдрома и снижения инфекционной нагрузки бактопатогенов.

#### **Список использованной литературы:**

1. Горбунова М.Л. Высеваемость бактерий-продуцентов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из мекония новорожденных, молока и молозива рожениц [Текст] / М.Л. Горбунова // Сб. научн. тр. ДГМА. – Днепропетровск, 1969. – № 4. – С. 173-175.
2. Данилович Ю.В. Взаимосвязь образования оксида азота и пероксида водорода стромальными клетками эндометрия [Электронный ресурс]: Тез. 5-ой Пушин. школы-конф. молодых ученых «Биология – наука 21-го века». – 2001. <http://www.smu.psn.ru>
3. Дзыза В.Г. Элективная питательная среда для выделения бактерий продуцентов перекиси водорода [Текст] / В.Г. Дзыза // Антибиотики. – К., 1968. – С. 139-142.
4. Дуглас У. Целительные свойства перекиси водорода: пер. с англ. / Дуглас У. – СПб.: Питер, 2003. – 160 с.

5. Зенков Н.К. Окислительный стресс [Текст] / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меншикова // М.: Наука, 2001. – 342 с.
6. Одескин А.В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов [Текст] / А.В. Одескин, И.В. Ботченко, Е.А. Цавкелова // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 3. – С. 309-327.
7. Скулачев В.П. Явление запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода [Текст] / В.П. Скулачев // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т. 7, № 5. – С. 4-40.
8. Хавкин А.И. Микробиоз кишечника и иммунитет [Текст] / А.И. Хавкин // Рус. мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 3. – С. 122-125.
9. Черняев С.А. Гетерогенность бактерий рода *Aerococcus* и их роль в разработке пробиотиков и контроле их аутентичности: Автореферат дис. ... канд. мед. Наук / Черняев С.А. – Х., 2002. – 22 с.
10. Ballester J.M. Purification of the viridocine produced by *Aerococcus viridans* [Text] / J.M. Ballester, M. Ballester, J.P. Belaich // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1980. – Vol. 17, № 5. – P. 784-788.
11. Halliwell B. Hydrogen peroxide in the human body [Text] / B. Halliwell, M.V. Clements, L.H. Longa // *FEBS Letters.* – 2000. – № 486. – P. 10-13.
12. Klein J.A. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration [Text] / J.A. Klein, S.L. Ackerman // *J. Clin. Invest.* – 2003. Vol. 111, № 6. – P. 785-793.
13. Evans J.B. Genus *Aerococcus* Williams, Herch and Cowan 1953 // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* – 1986. – № 2. – P. 1080.
14. Evans P. Free Radicals and Hearing: Cause, Consequence and Criteria [Text] / P. Evans, B. Halliwell // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1999. – № 884. – P. 19-40.

**Бібсн І.А. Вплив *Aerococcus viridians* штаму BI-07 на сальмонельоз у білих мишей за сумультанного застосування антагоністів**

Одним з пріоритетних напрямків ветеринарної медицини на сучасному етапі є створення гуманних та екологічно чистих технологій утримання тварин, з метою отримання біобезпечної та фізіологічно якісної продукції тваринництва. Застарілим і екологічно неприйнятним є використання кормових антибіотиків для збереження молодняка і в якості стимуляторів росту. Безумовною альтернативою кормовим антибіотикам є пробіотичні препарати з резидентної мікрофлори.

Активними антагоністичними властивостями по відношенню до кишкових бактеріальних патогенів володіє *Aerococcus viridans*. Антимікробна активність аерококів забезпечується продукцією перекису водню і комплексним стимулюючим впливом на імунореактивність макроорганізму. У нашій роботі ми ізолювали із здорового організму культуру аерококів і вивчили її вплив на інфекційний процес при сальмонельозній інфекції на білих мишах в якості терапевтичного та профілактичного засобу. При цьому встановили, що при сальмонельозі, емерджентній інфекції для білих мишей, культура аерококів надає слабковиражений терапевтичний вплив, однак при попередній і превентивній дачі надає ефективну протидію розвитку сальмонельозній інфекції у білих мишей.

**Ключові слова:** *Aerococcus viridans* штаму BI-07, білі миші, сальмонельоз, мікробний антагонізм, профілактика кишкових інфекцій.

**Biben I.A. Effect of strain *Aerococcus viridans* BI-07 for salmonellosis by white mice at simultaneous antagonists**

*Abstract. One of the priorities of Veterinary Medicine at the present stage is to create a humane and environmentally friendly technologies of animals, in order to obtain physiologically biosafety and quality of livestock products. Outdated and environmentally unacceptable is the use of feed antibiotics to save the young, and as growth promoters. Unconditional alternative to feed antibiotics are probiotic preparations of the resident microflora.*

*Active antagonistic properties with respect to the enteric bacterial pathogens is *Aerococcus viridans*. Antimicrobial activity aerococci provides production of hydrogen peroxide and a complex stimulating effect on the immunoreactivity of the microorganism. In our study, we isolated from a healthy body culture aerococci and studied its effect on the infectious process with *Salmonella* infection in white mice as a therapeutic and prophylactic agent. At the same time found that the emergent infection in white mice, culture aerococci has a weakly expressed therapeutic effect, but the pre-preventive cottage has an effective opposition to the development of *Salmonella* infection in white mice.*

**Keywords:** *Aerococcus viridans* strain BI-07, white mice, salmonella, microbial antagonism, prevention of intestinal infections.

Дата надходження до редакції: 31.03.2015 р.

Рецензент: д.вет.н., професор Кассіч В.Ю.