



Научная статья

УДК 619:636.5.033:579.62

Антибактериальная активность глюкозооксидазы в отношении устойчивых микроорганизмов птицеводческих предприятий

Марина Александровна Леонова¹, Сергей Владимирович Леонов¹, Екатерина Андреевна Тареева¹, Максим Алексеевич Силин²

¹ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН);

²ООО «НОВАБИОТИК»

Аннотация: Целью работы являлось изучение влияния фермента глюкозооксидазы на условно-патогенные и патогенные микроорганизмы: *Escherichia coli* (из открытого водоема, используемого животными для водопоя и водоплавающей птицей), *Pseudomonas aeruginosa* (с поверхности оборудования системы водопоя), *Enterococcus faecalis* (из бедренного сустава птицы), *Salmonella enterica subsp. houtenaе* (из комбикорма для промышленной птицы). Изучаемые изоляты отличаются высокой устойчивостью к антибактериальным препаратам широкого спектра действия и физико-химическим факторам внешней среды. Взвесь суточных культур бактерий ($1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл) вносили в лунки плоскодонного планшета с забуференной пептонной водой; в опытные лунки также добавляли фермент (в виде препарата «Новатур»*) в концентрации 200,0 г/т. Инкубацию и считывание проводили в Тесап Spark 10М (Тесап) по программе: шейкирование каждые 10 мин, 96 об./мин и амплитуда 6 мм, +37,0°C, оценка оптической плотности после шейкирования, каждые 15 мин, с усреднением показателей по 9 лучам при длине волны 530 нм. Установлено, что в течение 29 ч ферментный препарат в рекомендованной дозе 200 г/т сдерживал рост изученных бактерий, в отличие от контрольных лунок, куда фермент не добавляли, и где концентрация бактерий увеличивалась за 29 ч инкубации до $6,8-9,2 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: бантибиотикорезистентность, глюкозооксидаза, кишечная палочка, синегнойная палочка, энтерококк, сальмонелла, антибактериальный эффект.

Для цитирования: Леонова, М.А. Антибактериальная активность глюкозооксидазы в отношении устойчивых микроорганизмов птицеводческих предприятий / М.А. Леонова, С.В. Леонов, Е.А. Тареева, М.А. Силин // Птицеводство. – 2023. – №6. – С. 57-62.

doi: 10.33845/0033-3239-2022-72-6-57-62

Введение. В промышленном птицеводстве длительное время считалось основополагающим применение кормовых антибиотиков для снижения развития вторичных инфекций [1]. Однако при поражении кишечника и усиленной десквамации слизистой существует высокий риск попадания крупных молекул антибиотика в кровотоки и далее в мышечную ткань [2].

Кормовые антибиотики ориентированы на разрушение наружной клеточной стенки бактерий, поэтому подавляют преимущественно Грам-положительную

микрофлору. При этом антибиотики могут оставаться в мясе, даже после его термической обработки.

Применение бактериальных вакцин в птицеводстве сложно технологически (особенно инъекционных препаратов), а формирование иммунного ответа длительно; при вакцинации, например, от сальмонеллы вакцины зачастую не вызывают достаточной перекрестной защиты от разных серотипов патогена, циркулирующих на птицефабриках [3].

Нанометаллы блокируют не только экзоферменты бактерий,

но и ферменты пищеварительного тракта организма хозяина-птицы. Также необходимо учитывать, что взаимодействие металла с белковыми структурами клеток эпителиоцитов приводит к ускорению десквамации, и при длительном применении создает условия для развития сепсиса [4].

Применение бактериофагов долгое время считалось решением проблемы антибиотикорезистентности. Однако чтобы заменить антибиотики фагами, необходимо учитывать ряд характеристик, обеспечивающих высокую специфич-



ность к определенному виду бактерии. Поскольку фаги являются вирусами, иммунная система организма птицы может рассматривать их как активный антиген и, следовательно, они могут быть быстро элиминированы из системного кровообращения за счет клиренса ретикуло-эндотелиальной системы до того, как они аккумулируются в местах-мишенях, или же они могут инактивироваться механизмами адаптивной иммунной защиты. Длительная терапия может приводить к тому, что бактерии приобретают устойчивость к фагам путем мутации [5]. Некоторые фаги могут выживать в кишечнике только тогда, когда количество бактерий достигает определенного числа. Фаги могут только уменьшать, но не полностью устранять *S. typhimurium* в кишечнике животных [6].

Маннанолигосахариды, как пребиотики, сами по себе не могут ингибировать и убивать патогены, поэтому они не могут предотвращать или лечить бактериальные инфекции, как это делают антибиотики [5].

Препараты на основе органических кислот применяют в птицеводстве для подавления развития патогенных бактерий в корме и воде. Одной из новых проблем, связанных с использованием органических кислот в качестве альтернативы антибиотикам, является их способность повышать выживаемость чувствительных к кислоте патогенов, подвергающихся воздействию низкого pH, путем индукции у них толерантности к кислоте [7]. К негативным сторонам органических кислот также можно отнести истощение поджелудочной железы и формирование и рост популяции бактерий, которые, разрушая низкомолекулярные органические кислоты, используют их в качестве источника энергии [5].

Экстракты растений, также известные как фитобиотики, используют в кормлении животных и птицы благодаря их антимикробной, противовоспалительной, антиоксидантной и антипаразитарной активности [8,9]. Однако из-за сложного состава биоактивных компонентов проводить систематические и всесторонние токсикологические исследования, оценку безопасности, активности трав и их экстрактов затруднительно, так как нормы и регламенты на этот счет пока отсутствуют [5].

Таким образом, в современном мире остается актуальным поиск препарата с широким спектром антибактериальной активности, при этом применимого в разные технологические периоды, без необходимости учета времени выведения самого препарата (либо его метаболитов) в период предубойной выдержки птицы. Такой высокоэффективной альтернативой антибиотикам может стать использование ферментов, например, глюкозооксидазы. Применение этого фермента исключает формирование антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов ввиду того, что его антибактериальный эффект в значительной степени зависит от его способности генерировать и накапливать перекись водорода в окружающей среде в результате перекисного окисления глюкозы [10].

Цель исследования – определить в опыте *in vitro* антибактериальную эффективность рекомендованной дозы препарата глюкозооксидазы в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, часто выделяемых с объектов промышленных птицеводческих предприятий.

Материал и методика исследований. Исследования по определению влияния глюкозоокси-

дазы на динамику роста тестовых изолятов микроорганизмов (МО) были проведены на базе лаборатории болезней птиц Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ИЭВ-СидВ) СФНЦА РАН.

В качестве объекта исследований был использован препарат «Новатур»® (ООО «Новабтиотик», Россия). Препарат представляет собой фермент глюкозооксидазу в водорастворимой форме с итоговой концентрацией 200,0 г/т. Активность фермента – не ниже 1000,0 ед./г; рабочий диапазон pH – 2,5-7,0; диапазон рабочей температуры – 30,0-70,0°C при оптимуме 37,0-40,0°C.

Для тестирования использовали изоляты МО, выделенные у птицы и из промышленных птицеводческих объектов, и отличающиеся высокой устойчивостью к физико-химическим факторам внешней среды:

1. *Escherichia coli* №2863/22 – изолят, выделенный из открытого водоема, используемого животными для водопоя и водоплавающей птицы. Характеристики: чувствителен к антибактериальным препаратам широкого спектра действия; устойчив к нагреву до +45°C; устойчив к ультрафиолетовому облучению (длина УФ-волны 290 нм) до 20 мин.

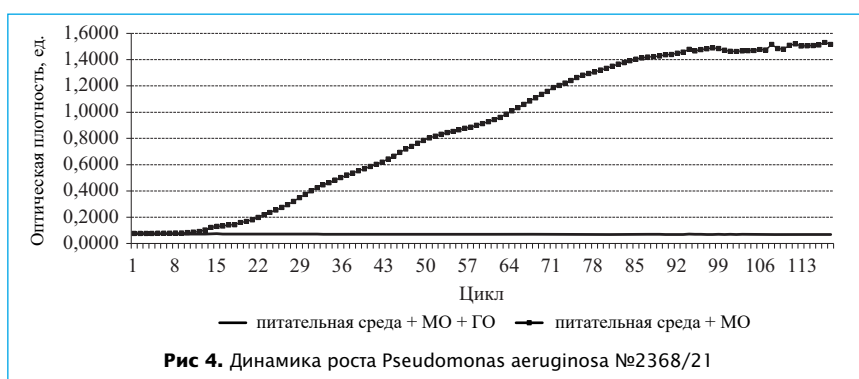
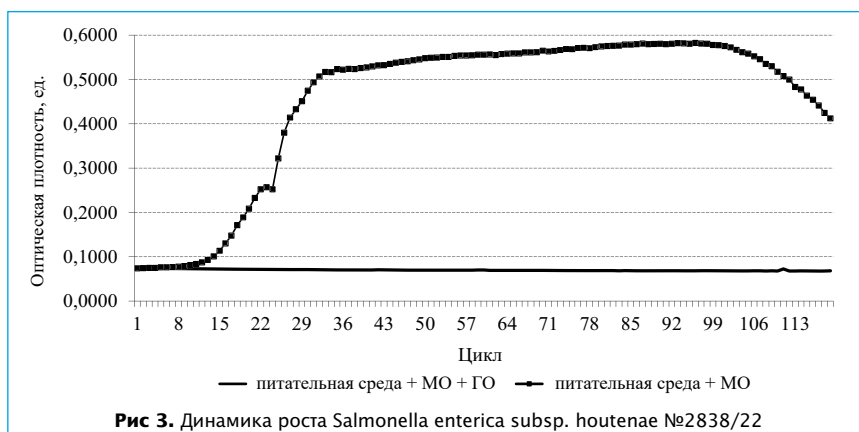
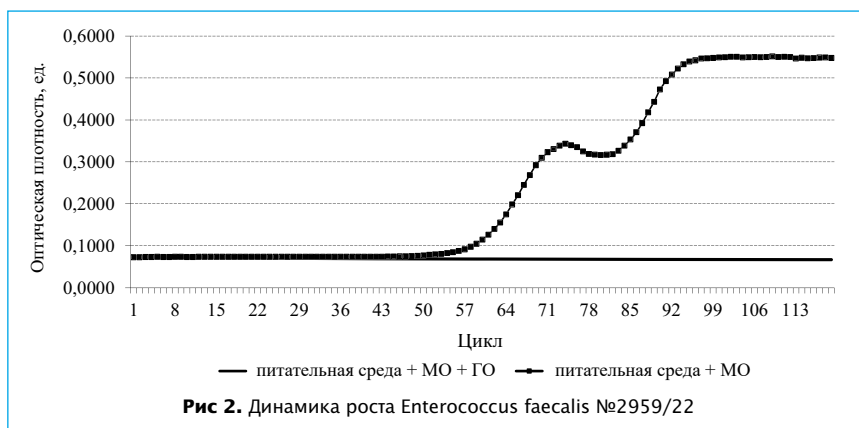
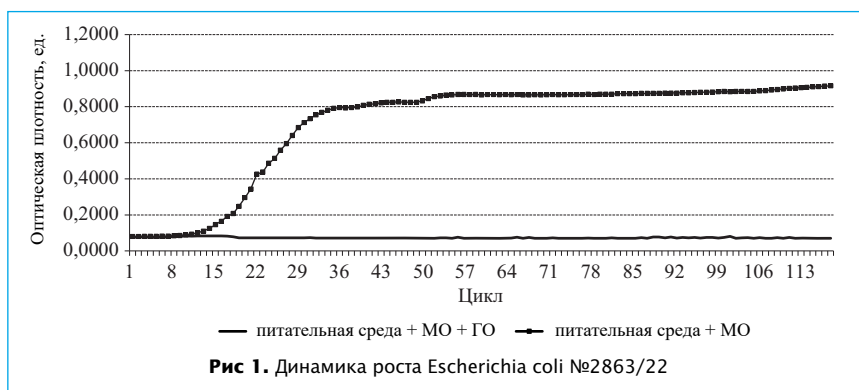
2. *Enterococcus faecalis* №2959/22 – изолят, выделенный из опорного аппарата птицы (бедренный сустав). Характеристики: обладает высокой протеолитической активностью (на модифицированном агаре Эйкмана просветление вокруг колонии появлялось уже спустя 18 ч инкубирования); устойчив к широкому спектру антибиотических препаратов (в частности к гентамицину, канамицину, амоксициллину, тетрациклину, док-



сицилину, норфлоксацину, энрофлоксацину, офлоксацину, флорфениколу, хлорамфениколу, полимиксину, фуразолидону, цефотаксиму, линкомицину, азитромицину, тилозину); устойчив к УФ-облучению (длина волны 290 нм) до 30 мин, повышенным температурам (до +45°C), кислотам и их солям.

3. *Salmonella enterica subspecies houtenae* №2838/22 – изолят, выделенный из комбикорма для промышленной птицы. Характеристики: чувствителен к антибиотикам, за исключением полипептидной группы (полимиксин); устойчив к кормовым антибиотикам – флавофосфолипол, энрамицин, авиламицин, вирджиниомицин, мультиомицин + китасамицин, бацитрацин; устойчив к нагреву до +45°C, устойчив к УФ-облучению (длина волны 290 нм) до 30 мин.

4. *Pseudomonas aeruginosa* №2368/21 – изолят, выделенный с поверхности оборудования системы водопоя. Характеристики: устойчив к гентамицину, канамицину, амоксициллину, амоксиклаву, ампициллину, тетрациклину, доксициклину, норфлоксацину, энрофлоксацину, офлоксацину, флорфениколу, хлорамфениколу, полимиксину, фуразолидону, цефотаксиму, сульфаниламидам, триметоприму, линкомицину, тилозину; устойчив к нагреву до +60°C, обработка УФ (290 нм) – устойчив до 60 мин; обладает выраженной каталазной активностью. Обладает способностью инактивировать перекисные соединения и слабые растворы формальдегида. Мукоидная (биопленкообразующая) форма изолята способна производить мукоидный альгинат (т.е. образует слизь, защищающую бактерии) в большом количестве при воздействии неблагоприятных фак-



торов. При их отсутствии быстро переключается на немучоидный фенотип.

На первом этапе изоляты МО восстанавливали суточным культивированием при 37,0°C из лиофи-



лизированного состояния на средах, обогащенных факторами роста (бульон Хоттингера, мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар), с добавлением 5,0% стерильной сыворотки лошади. Из суточных культур МО готовили взвесь с концентрацией 0,5 ед. по МакФарленду ($1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл) на стерильном физрастворе (0,9% растворе хлорида натрия). Получаемую взвесь тестировали методом серийных разведений на приборе спирального посева EasySpiral (Interscience, Франция) с последующей оценкой результата на приборе подсчета колоний Scan 500 (Interscience).

На втором этапе пересев МО проводили в забуференную пептонную воду (ЗПВ; ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия), приготовленную согласно рекомендациям производителя. Для культивирования МО использовали полистироловый плоскодонный прозрачный 96-луночный планшет Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, США; cat. №456529) с крышкой.

В лунки планшета вносили по 180,0 мкл стерильной ЗПВ, после чего в экспериментальные лунки вносили взвесь микроорганизмов (1 млрд. КОЕ/мл) в 6 повторях в объеме 10,0 мкл. В лунки положительного контроля вносили взвесь МО в объеме 10,0 мкл и 10,0 мкл стерильного физраствора. В лунки отрицательного контроля вносили 20,0 мкл стерильного физраствора. В экспериментальные лунки вносили по 10,0 мкл стерильного физраствора с фер-

ментом, создавая его итоговую концентрацию 200,0 г/т.

Для выравнивания старта роста и снижения влияния манипуляций на динамику роста планшет находился на подложке из ДТ16 на охлаждаемом столике (температура +4,0°C).

Заполненный планшет закрывали крышкой и помещали в Tecan Spark 10M (Tecan, Швейцария), устанавливали программу: шейкирование каждые 10 мин при 96 об./мин, амплитуде 6 мм, +37,0°C. Оценку оптической плотности каждой лунки проводили в автоматическом режиме, после шейкирования, каждые 15 мин, с усреднением показателей по 9 лучам. Длина волны 530 нм. Мониторинг и контроль работы оборудования проводили посредством SPARKCONTROL Dashboard.

Через 29 ч из инокулированных МО лунок были отобраны образцы для определения концентраций микроорганизмов, которое проводили методом спирального посева EasySpiral (Interscience). После чего проводили подсчет КОЕ/мл по полученным оптическим плотностям методом сплайн-интерполяции.

Результаты исследований и их обсуждение. В контрольной лунке рост тестового изолята кишечной палочки начинался спустя 3,25 ч с начала инкубации планшеты. Во всех экспериментальных лунках рост не отмечен (рис. 1). Спустя 29 ч инкубации концентрация бактерий составила $6,8 \times 10^9$ КОЕ/мл, во всех экспериментальных лунках рост не выявлен.

Рост тестового изолята энтерококка в контрольной лунке начался спустя 17 ч с начала инкубации. Во всех экспериментальных лунках рост не отмечен (рис. 2). Через 29 ч инкубации концентрация энтерококка составила $8,6 \times 10^9$ КОЕ/мл, ни в одной из экспериментальных лунок рост не выявлен.

В контрольной лунке рост тестового изолята сальмонеллы начался уже спустя 3,5 ч, тогда как во всех экспериментальных лунках рост не отмечен (рис. 3). Спустя 29 ч инкубации концентрация патогена составила $6,9 \times 10^9$ КОЕ/мл, ни в одной из экспериментальных лунок рост не выявлен.

В контрольной лунке рост тестового изолята синегнойной палочки начинался уже спустя 3,5 часа с момента инкубации планшеты, а спустя 29 ч ее концентрация составила $9,2 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. При этом во всех экспериментальных лунках рост отмечен не был (рис. 4).

Заключение. Экспериментально установлено, что препарат «Новатур»® (ООО «Новабактер», Россия), содержащий фермент глюкозооксидазу в водорастворимой форме с итоговой концентрацией 200,0 г/т, оказывает стойкий бактерицидный эффект в отношении полевых изолятов *Escherichia coli* №2863/22, *Enterococcus faecalis* №2959/22, *Salmonella enterica subsp. houtenae* №2838/22, *Pseudomonas aeruginosa* №2368/21, обладающих рядом характеристик, препятствующих воздействию на них стандартных методов терапии и профилактики.

Литература / References

1. Черкашина, Н.В. Анализ современного состояния проблемы использования антибиотиков в качестве кормовой добавки / Н.В. Черкашина, Л.И. Дроздова, В.Л. Махортов [и др.] // Аграрный вестник Урала. - 2011. - №3. - С. 39-42. [Cherkashina NV, Drozdova LI, Makhortov VL, Vasiliev PG, Shcherbakov MG, Ilyazov AA, Sirik MS (2011) Analysis of the current state of the problem of use of antibiotics as feed additive. *Agrar. Her. Ural*, (3):39-42 (in Russ.)]



- Грозина, А.А. Морфологическая оценка стенки кишечника цыплят кросса «Кобб 500» на фоне применения антибиотика и пробиотика / А.А. Грозина, В.В. Пронин, М.С. Дюмин // Рос. вет. журнал. С.-х. животные. - 2014. - №4. - С. 16-17. [Grozina AA, Pronin VV., Dyumin MS (2014) Morphological evaluation of the intestinal wall in chicken cross "Cobb 500" on the background use of antibiotic and probiotic. *Rus. Vet. J. Agric. Anim.*, (4):16-7 (in Russ.)]
- Desin, T.S. Salmonella vaccines in poultry: past, present and future / T.S. Desin, W. Koster, A.A. Potter // *Expert Rev. Vaccines*. - 2013. - V. 12. - No 1. - P. 87-96. doi: 10.1586/erv.12.138.
- Olagoke, F.K. Control of soil extracellular enzyme activities by clay minerals – perspectives on microbial responses / F.K. Olagoke, K. Kalbitz, C. Vogel // *Soil Syst.* - 2019. - V. 3. - No 4. - P. 64. doi: 10.3390/soilsystems3040064.
- Cheng, G. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? / G. Cheng, H. Hao, S. Xie, X. Wang, M. Dai, L. Huang, Z. Yuan // *Front. Microbiol.* - 2014. - V. 5. - P. 217. doi: 10.3389/fmicb.2014.00217.
- Callaway, T.R. Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce Salmonella populations in growing swine / T.R. Callaway, T.S. Edrington, A. Brabban, B. Kutter, L. Karriker, C. Stahl, E. Wagstrom, R. Anderson, T.L. Poole, K. Genovese, N. Kruger, R. Harvey, D.J. Nisbet // *Foodborne Pathog. Dis.* - 2011. - V. 8. - No 2. - P. 261-266. doi: 10.1089/fpd.2010.0671.
- Ricke, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials / S.C. Ricke // *Poult. Sci.* - 2003. - V. 82. - No 4. - P. 632-639. doi: 10.1093/ps/82.4.632.
- Vondruskova, H. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review / H. Vondruskova, R. Slamova, M. Trckova, Z. Zraly, I. Pavlik // *Vet. Med.* - 2010. - V. 55. - No 5. - P. 199-224. doi: 10.17221/2998-VETMED.
- Hashemi, S.R. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition / S.R. Hashemi, H. Davoodi // *Vet. Res. Commun.* - 2011. - V. 35. - No 3. - P. 169-180. doi: 10.1007/s11259-010-9458-2.
- Cooper, R.A. Inhibition of biofilms by glucose oxidase, lactoperoxidase and guaiacol: the active antibacterial component in an enzyme alginogel / R.A. Cooper // *Int. Wound J.* - 2013. - V. 10. - No 6. - P. 630-637. doi: 10.1111/iwj.12083.

Сведения об авторах:

Леонова М.А.: кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник; 348-39-31@mail.ru. **Леонов С.В.:** старший научный сотрудник. **Тареева Е.А.:** младший научный сотрудник. **Силин М.А.:** руководитель. Статья поступила в редакцию 14.04.2023; одобрена после рецензирования 11.05.2023; принята к публикации 20.05.2023.

Research article

Antibacterial Activity of Glucose Oxidase Against Resistant Pathogens Typical to Poultry Farms

Marina A. Leonova¹, Sergey V. Leonov¹, Ekaterina A. Tareeva¹, Maksim A. Silin²

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agrobiotechnologies of Russian Academy of Sciences; ²NOVABIOTIC, LCC

Abstract. The aim of the work was to study the effect of enzyme glucose oxidase on opportunistic and pathogenic microorganisms: *Escherichia coli* (isolated from an open water basin used by animals for watering and by water-fowl), *Pseudomonas aeruginosa* (from the surface of drinking equipment in a poultry house), *Enterococcus faecalis* (from the femur of a bird), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (from commercial compound feed for poultry). The isolates studied are highly resistant to broad-spectrum antibacterial drugs and physical and chemical environmental factors. A suspension of daily bacterial cultures (1.0×10^9 CFU/mL) was added to the wells of a flat-bottom plate with buffered peptone water; the enzyme (as preparation Novatur®) in concentration 200 ppm was added to the experimental wells. Incubation and reading were carried out on Tecan Spark 10M line according to the program: shaking every 10 minutes, 96 RPM and an amplitude 6 mm, +37.0°C, assessment of optical density after



shaking at wavelength 530 nm every 15 minutes, averaging of 9 beams. It was found that during 29 hours of the incubation the enzyme inhibited growth of the tested bacteria, as opposed to the control wells where the enzyme was not added and where the increases in the concentrations of the pathogens during 29 hours of incubation to $6.8-9.2 \times 10^9$ CFU/mL were found.

Keywords: antibiotic resistance, glucose oxidase, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus*, *Salmonella*, anti-bacterial effect.

For Citation: Leonova M.A., Leonov S.V., Tareeva E.A., Silin M.A. (2023) Antibacterial activity of glucose oxidase against resistant pathogens typical to poultry farms. *Ptitsevodstvo*, 72(6): 57-62. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2022-72-6-57-62

(For references see above)

Author:

Leonova M.A.: Cand. of Vet. Sci., Senior Research Officer; 348-39-31@mail.ru. **Leonov S.V.:** Senior Research Officer. **Tareeva E.A.:** Junior Research Officer. **Silin M.A.:** Director.

Submitted 14.04.2023; revised 11.05.2023; accepted 20.05.2023.

© **Леонова М.А., Леонов С.В., Тареева Е.А., Силин М.А., 2023**