

НОВЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДОБАВКИ ДЛЯ ПТИЦЕВОДСТВА

Риш.С. Мухаммадиев^{1,3}, Рин.С. Мухаммадиев^{1,3}, А.С. Мухаммадиева², Д.А. Сорокина³,
В.Г. Гумеров³

¹Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, р. п. Большие Вяземы,
Одинцовский р-н, Московская обл., e-mail: tashir9891@mail.ru

²Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, Казань,
Российская Федерация

³Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности,
Казань, Российская Федерация

***Аннотация.** В работе изучены колонизирующие и антимикробные свойства штаммов *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24. Полученные результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования данных микроорганизмов и их биологически активных веществ для создания метапробиотических добавок для птицеводства.*

***Ключевые слова:** бактерии, биологически активные метаболиты, адгезивные и антимикробные свойства, метапробиотики, птицеводство*

Введение. На микробную экологическую систему сельскохозяйственных птиц оказывают ряд факторов, таких как нерациональное кормление и содержание, применение антибиотиков, ограничение контакта с окружающей средой и широкая химизация птицеводства [1]. Указанные факторы приводят к количественным и качественным сдвигам в популяциях микроорганизмов, колонизации желудочно-кишечного тракта условно-патогенными и патогенными видами бактерий, нарушениям функционирования внутренних органов и систем организма и, тем самым к резкому понижению естественной резистентности птицы [1].

Одним из наиболее перспективных подходов в области лечения болезней пищеварительного тракта сельскохозяйственных птиц является применение биологических препаратов на основе полезных микроорганизмов (пробиотики) отдельно (метабиотики) или совместно с их продуктами метаболизма (метапробиотики). К настоящему времени российскими и зарубежными исследователями получены и накоплены существенные результаты, которые свидетельствуют о наличии комплексных свойств пробиотических микроорганизмов, способствующих восстановлению уровня и оптимизации функции микробиоты кишечника животных [2]. Микроорганизмы с пробиотическими свойствами обладают способностью образовывать вещества с иммуномодулирующими, антибиотическими, детоксикационными и антиоксидантными действиями, гидролитические ферменты, витамины, аминокислоты, пептиды и полисахариды [1; 3]. При обоснованном использовании пробиотических штаммов и их биологически активных метаболитов, они способствуют подавлению условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, выведению токсичных соединений, стимуляции местной защиты желудочно-кишечного тракта и улучшению обменных процессов макроорганизма [2].

Многие обнаруженные пробиотические микроорганизмы считаются представителями облигатной микробиоты кишечника животных и птиц, и добавки на основе их безвредны, безопасны для окружающей среды, могут быть применены в любом возрасте без ограничений в животноводстве [1]. В связи с этим вопрос создания и внедрения в ветеринарную практику современных биологических препаратов на основе новых пробиотических микроорганизмов (пробиотиков) и совместно с их метаболитами

(метапробиотиков) не теряет своей актуальности. Однако в нашей стране при выборе штаммов микроорганизмов - кандидатов в пробиотики или метапробиотики для возможности их применения в птицеводстве, исследователи обращают внимание, главным образом, на спектр и уровень их антагонистической активности в отношении возбудителей кишечных инфекций сельскохозяйственной птицы, что явно недостаточно. Проблема адгезии микроорганизмов с пробиотическими свойствами привлекает особое внимание биотехнологов с точки зрения ее значения в процессах, обеспечивающих регулирование ими кишечной микробиоты макроорганизма.

Цель работы – изучение *in vitro* адгезивных и антимикробных свойств штаммов *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24 для возможности их применения в качестве метапробиотических добавок в птицеводстве.

Материалами для исследований являлись полученные из фонда Коллекции культур микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (Московская обл., Одинцовский р-н, Российская Федерация) штаммы *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24. Для выращивания бактерий применяли MRS (Conda, Испания) и ГРМ (Оболensk, Россия) среды, а также стерильное обезжиренное молоко. В качестве тест-объектов применили грамотрицательные (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*) и грамположительные (*Staphylococcus aureus*,) бактерии, выделенные от погибших цыплят с клиническими признаками кишечных инфекций.

Оценку адгезивных свойств бактериальных штаммов проводили методом Брилиса с применением эритроцитов человека 0 (I) группы Rh+ [4]. Для этого инкубировали смесь суспензий бактерий (с концентрацией $1,0 \times 10^9$ КОЕ/мл) и эритроцитов ($1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл) при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин. После чего готовили мазки, фиксировали этиловым спиртом (96 %) в течение 15 мин и окрашивали их по Романовскому-Гимза.

Адгезивные свойства изучаемых штаммов в отношении эритроцитов оценивали по нескольким показателям:

1. Средний показатель адгезии (СПА) - среднее количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту (при подсчете 50 эритроцитов);
2. Коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе (К) - процент эритроцитов, которые имеют на своей поверхности адгезивные бактерии;
3. Индекс адгезивности бактерий (ИАБ) - среднее количество бактериальных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците: $\text{ИАБ} = \text{СПА} \cdot 100 / \text{К}$.

Штаммы бактерий считали неадгезивными при СПА от 0 до 0,99 и ИАБ равной или ниже значения 1,75; низкоадгезивными при СПА 1,0 до 1,99 и ИАБ от 1,76 до 2,49; среднеадгезивными при СПА 2,0 до 3,99 и ИАБ от 2,50 до 3,99; высокоадгезивными при СПА и ИАБ равной или больше 4,0.

Скрининг на способность к продукции бактериоцинов исследуемыми штаммами осуществляли диско-диффузионным способом [5]. Для этого использовали пептидный образец, полученный из культуральной жидкости микроорганизма. Отбор проб культуральной жидкости проводили на 2 сутки его выращивания. Клеточную массу отделяли от культурального супернатанта методом центрифугирования (10 тыс. об/мин, 15 мин, 4°C). Осаждение бактериоцинов осуществляли кристаллическим сульфатом аммония различного насыщения (12 ч, 4°C). Образовавшийся осадок собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 30 мин, 4°C) и растворяли в минимальном количестве фосфатного буфера (0,01 М, рН 7,0). Полученную суспензию диализовали мембранами с размером пор 3,5 кДа («Orange Scientific», Бельгия) против буферного раствора (24 ч, 4°C). На поверхность питательной среды с инокулированной тест-культурой наносили диски, пропитанные пептидным образцом. В качестве тест-культур использовали возбудителей кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственной птицы. Активность бактериоцинов выражали в миллиметрах диаметра зоны задержки роста тестируемого микроорганизма вокруг дисков.

Одним из важных свойств, характеризующих штамм пробиотического микроорганизма, является его колонизирующая способность, которая во многом

определяется процессом адгезии к эпителиальным клеткам кишечника. В связи с этим для оценки колонизирующего потенциала штаммов *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24 нами была изучена адгезивные их свойства в отношении эритроцитов I группы крови человека.

Результаты исследования показали, что все изучаемые бактериальные штаммы обладали способностью адгезировать к эритроцитам человека группы крови 0 (I) (таблица 1). *L. acidophilus* IV138 и *B. subtilis* GA24 характеризовались средней адгезивной активностью: значение ИАМ составило соответственно ($2,97 \pm 0,15$) и ($3,48 \pm 0,16$ ед). Штамм *P. acidilactici* PA-12 обладал более низкими адгезивными свойствами.

Таблица 1. Показатели адгезии исследуемых штаммов бактерий

Штамм	СПА, клеток	К, % эритроцитов	ИАМ, ед (кл/эр)	Уровень адгезии
<i>L. acidophilus</i> IV138	$2,26 \pm 0,11$	$76,0 \pm 2,9$	$2,97 \pm 0,15$	Средний
<i>B. subtilis</i> GA24	$2,72 \pm 0,13$	$78,1 \pm 3,2$	$3,48 \pm 0,16$	Средний
<i>P. acidilactici</i> PA-12	$1,04 \pm 0,05$	$73,4 \pm 3,1$	$1,42 \pm 0,06$	Низкий

Среднеадгезивные бактерии, по сравнению с микроорганизмами с более низким уровнем адгезии, могут эффективнее закрепляться на поверхности клеток кишечника, уменьшать возможность прикрепления условно-патогенных микроорганизмов и стимулировать рост и развитие кишечной нормофлоры, таким образом, улучшать пищеварение и перистальтику кишечника сельскохозяйственных птиц. Они способны эффективнее стимулировать фагоцитарную активность иммунокомпетентных клеток, обеспечивая иммунный ответ организма. Указанные факторы могут позитивно влиять на устойчивость к инфекционным агентам организма сельскохозяйственных птиц и обеспечивать их ростостимулирующий эффект.

Известно, что пробиотические бактерии секретируют в окружающую среду различные антимикробные метаболиты. Среди них выделяется группа рибосомально синтезируемых пептидов и белков, или бактериоцины, отличающиеся от остальных экзометаболитов уникальной способностью преодолевать устойчивость и вирулентность различных микроорганизмов. Тем не менее, уровень и спектр антибактериального эффекта бактериоцинов индивидуальны для различных видов и штаммов бактерий с пробиотическими свойствами.

Оценка бактериоциногенности штаммов *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24 бактерий диско-диффузионным способом показала, что большинство из них характеризовались выраженной способностью продуцировать белки или пептиды с антимикробным эффектом в отношении возбудителей кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственной птицы. Результаты оценки антимикробной активности бактериоцинов исследуемых бактериальных штаммов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты определения антимикробной активности бактериоцинов исследуемых бактериальных штаммов*

Штамм	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<i>P. acidilactici</i> PA-12	+++	+++	+++
<i>B. subtilis</i> GA24	+++	+++	+++
<i>L. acidophilus</i> IV138	+	++	++

Примечание: *«+», «++», «+++» - степень проявления антимикробного эффекта бактериоцинов

Из 3 изученных микроорганизмов штаммы *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24, обладали выраженной активностью бактериоцинов в отношении *E. coli*, *S. aureus* и *Salmonella sp.* Полученные данные свидетельствуют о возможности использования данных

штаммов в качестве продуцентов для получения бактериоцинов и бактериоциноподобных метаболитов.

Таким образом, результаты исследований *in vitro* показали, что штаммы *L. acidophilus* IV138, *P. acidilactici* PA-12 и *B. subtilis* GA24 обладают колонизирующими и антимикробными свойствами. Несмотря на низкую адгезивную активность отобранного нами микроорганизма *P. acidilactici* PA-12, штамм обладал ярко выраженным антибактериальным эффектом в отношении грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*) бактерий, выделенных от погибших цыплят с клиническими признаками кишечных инфекций. Полученные результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования данных микроорганизмов и их биологически активных веществ для создания кормовых добавок с метапробиотическими свойствами, предназначенных для нормализации кишечной микробиоты молодняка сельскохозяйственной птицы.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом Президента РФ МК-2439.2022.5 (соглашение № 075-15-2022-414 от «12» мая 2022 г.).

Библиографический список

1. Валиуллин Л.Р., Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С., Тимербаева Р.Р., Каримуллина И.Г, Яруллин А.И. Новые штаммы *Lactobacillus acidophilus* как перспективные пробиотики для птицеводства // Ветеринария Кубани. 2022. № 6. С. 16-21.
2. Валиуллин Л.Р., Мухаммадиев Р.С., Мухаммадиев Р.С., Егоров В.И., Рудь В.Ю., Глинушкин А.П. Бактерии - антагонисты возбудителей кишечных инфекций и продуценты комплекса целлюлаз как основа для создания добавок, объединяющих функции пробиотика и кормового фермента // Достижения науки и техники АПК. 2021. Т. 35. № 9. С. 60-66.
3. Применение метода ПЦР-РВ для определения ДНК грибов и бактерий при консервировании зеленой массы люцерны штаммами *Lacticaseibacillus paracasei* и *Lactiplantibacillus plantarum* /Д.М. Афордоаньи, Ш.З. Валидов, И.Т. Бикчантаев, Е.О. Крупин // Аграрный научный журнал. 2021. №10. С. 73-76.
4. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т. А. Брилене, Х. П. Ленцнер, А. А. Ленцнер // Лабораторное дело. 1986. № 4. С. 210-213.
5. Зимина М.И., Просеков А.Ю., Сухих С.А., Бабиц О.О., Носкова С.Ю. Определение оптимальных условий культивирования для синтеза бактериоцинов штаммами *Bacillus endopheticus* и *Bacillus licheniformis* и изучение их стабильности // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 43. № 4. С. 22-29.