

Биотехнология, пробиотики, биологически активные препараты и другое

DOI 10.47804/978-5-89904-0290_2021_252

УДК 619:615.37.012

Оценка эффективных штаммов микроорганизмов для разработки новых пробиотических препаратов

¹ **Неминушая Л.А.**, д.б.н., в.н.с. отд. обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства; nem_la53@mail.ru

¹ **Еремец Н.К.**, к.б.н., зав. отд. обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства; ook_vnitibp@mail.ru

¹ **Скотникова Т.А.**, д.б.н., в.н.с. отд. обеспечения качества лекарственных средств для ветеринарии и животноводства; ook_vnitibp@mail.ru

² **Красочко П.А.**, д.в.н., д.б.н., профессор; krasochko@mail.ru.

¹ **Павленко И.В.**, д.т.н., зав. отд. разработки противобактерийных препаратов; ook_vnitibp@mail.ru

¹ **Казак А.В.**, аспирант; ook_vnitibp@mail.ru

¹ **Матвеева И.Н.**, д.б.н., зам. директора института

¹ **Маркова Е.В.**, к.с/х.н., с.н.с., ученый секретарь

¹ **Еремец В.И.**, д.б.н., зам. директора института

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский технологический институт биологической промышленности», Щелково, Московской обл., e-mail: vnitibp@mail.ru

² УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Evaluation of effective strains of microorganisms for the development of new probiotic drugs

¹ Neminushhaya L.A., ¹ Eremecz N.K., ¹ Skotnikova T.A., ² Krasochko P.A.,

¹ Pavlenko I.V., ¹ Kazaku A.V., ¹ Matveeva I.N., ¹ Markova E.V., ¹ Eremets V.I.

¹ Schelkovo

² Vitebsk, Respulic of Belarus

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, синбиотики, микроорганизмы, штаммы, антибиотики.

Key words: probiotics, prebiotics, synbiotics, microorganisms, strains, antibiotics.

Резюме. В соответствии с рекомендациями ФАО/ВОЗ по оценке пробиотиков исследованы свойства штаммов пробиотических бактерий *L. plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007) и *B. subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948), депонированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика по показателям: чувствительность бактерий к действию желудочного сока и желчи; резистентность к действию часто применяемых в хозяйствах антибиотиков; с учетом результатов исследований, проведенных в ВНИТИБП, предложена принципиальная рецептура нового синбиотика, представляющего собой комплекс препаратов про- и пребиотиков. Показана применимость классических методик к исследованию свойств пробиотических микроорганизмов; получены новые знания о механизмах действия пробиотических препаратов с целью создания экологически безопасных препаратов направленного действия.

Summary. In accordance with FAO/WHO recommendations for the evaluation of probiotics, the properties of *L. plantarum* strains of probiotic bacteria, strain 8РА3 (VKPM № В-11007) and *B. subtilis*, strain М-8 (VKPM № В-1948), deposited in the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) FGUP GosNIIGenetics in terms of: sensitivity of bacteria to gastric juice and bile; resistance to the action of antibiotics often used in farms; taking into account the results of studies carried out in VNITIBP, a principle formulation of a new synbiotic is proposed, which is a complex of preparations of pro- and prebiotics.

The applicability of classical techniques to the study of properties of probiotic microorganisms is shown; new knowledge about the mechanisms of action of probiotic preparations is obtained in order to create environmentally safe directed drugs.

Введение. Актуальным направлением в исследовании пробиотиков является разработка системного подхода к характеристике свойств штаммов микроорганизмов, которые могут быть эффективными пробиотиками [2].

В основном к пробиотическим культурам относят представителей защитной симбионтной флоры кишечника здоровых людей и животных, которые не содержат в своих геномах детерминируемых факторов патогенности, (главным образом рода *Bifidobacterium*, отдельные штаммы родов *Lactobacillus*, *Propionibacterium*). Среди специалистов достигнут консенсус

в требованиях к штаммам, отбираемым для использования в пробиотических продуктах.

Так, минимальными критериями здесь является то, что пробиотик должен быть:

- 1) идентифицирован на 3 уровнях: род, вид, штамм;
- 2) живым и присутствовать в достаточном количестве в продукте к концу срока годности;
- 3) обладать функциональными характеристиками, присущими штаммам-пробиотикам (например, устойчивость к кислотности желудка и желчи, антагонизм в отношении патогенных микроорганизмов, способность снижать адгезию патогенов к слизистой кишечника и др.), наличие которых доказано в контролируемых экспериментах *in vitro* и исследованиях *in vivo, ex vivo*.

Значимость этих критериев объясняется штаммоспецифичностью пробиотического эффекта. В свою очередь она зависит от наличия у конкретных микроорганизмов генетических детерминант, кодирующих выработку факторов, за счет которых данный эффект осуществляется. Например, у штамма *Bifidobacterium longum* BB536 в геномной ДНК был найден иммуностимулирующий олигодезоксинуклеотид BL07, стимулирующий пролиферацию В-лимфоцитов и индуцирующий выработку интерлейкина-12 в макрофагподобных J774.1 клетках, а у *Lactobacillus casei* Shirota – кластер генов, принимающих участие в биосинтезе высокомолекулярного полисахарида, который проявляет иммуномодулирующую функцию в кишечнике.

Очевидно, что экстраполировать результаты, полученные с одним пробиотическим штаммом, на другие штаммы этого вида нельзя. Конкретный эффект может быть приписан только определенному штамму или ассоциации штаммов, при этом обязательно учитывается влияние пищевой матрицы на экспрессию (выраженность) этих свойств.

В связи с этим главным вопросом обеспечения и контроля подлинности пробиотиков является точность их идентификации на уровне штамма. Для этого еще в 2002 г. FAO/ВОЗ были разработаны рекомендации по оценке пробиотиков в пищевых продуктах, согласно которым пробиотические штаммы должны быть идентифицированы с использованием высокоразрешающих методов, основанных на международно принятых воспроизводимых технологиях молекулярного анализа (ДНК-ДНК-гибридизация, пульс-электрофорез хромосомной ДНК, полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами), названы в соответствии с принятым современным каталогом бактериальной номенклатуры и задепонированы в национальных коллекциях культур международного уровня [5, 6, 7].

В ГФ 13 и 14 изд. впервые введены статьи, посвященные пробиотикам, которые отнесены к иммунобиотехнологическим препаратам.

С целью обеспечения единого подхода к оценке качества и безопасности штаммов пробиотических микроорганизмов и гармонизации нормативной базы, регулирующей оборот выработанной с их использованием продукции, эти положения включены в утвержденные в 2010 г. в России МУ 2.3.2.2789-10 [3].

Во ВНИТИБП проводятся исследования [1, 4] по подбору эффективных штаммов микроорганизмов, разработке рецептур новых препаратов и изучению механизмов действия клеточных и метаболитных пробиотиков на организм животных и птицы.

Материалы и методы. *Объекты исследований:* штаммы пробиотических бактерий *L.plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007) и *B.subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948), депонированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИ Генетика; тест-штаммы патогенных микроорганизмов.

Материалы:

- питательные среды (MPC-5, среда Эндо, МПА, МПБ, агар Сабуро, среда на основе молочной сыворотки) для количественного определения и глубинного культивирования микроорганизмов;
- диски, пропитанные стандартным набором тест-антибиотиков: кламоксил, левомецетин, тетрациклин, цефазолин, ампициллин, рифампицин, гентамицин, офлоксацин, ципрофлоксацин, энрофлон, линкомицин и флавомицин.

Резистентность пробиотиков к антибиотикам определяли *in vitro* методом диффузии в агар с использованием стандартных дисков.

Количество жизнеспособных бактерий определяли методом десятикратных разведений испытуемого материала в 0,85%-ном растворе хлористого натрия с последующим их высевом на среды MRS-5 и сусло-агар с добавлением 50 мкг/см³ канамицина, соответственно, инкубацией в термостате (при 37-39°C в течение 48 час) и подсчетом выросших колоний.

Результаты исследований и обсуждение. Согласно современным представлениям для получения более эффективного пробиотического действия необходимо использовать комплекс бактерий – симбиотиков и транзиторных бактерий. Чаще всего в качестве транзиторных бактерий используют бациллы *Bacillus subtilis*. Поэтому нами в качестве пробиотических штаммов были выбраны и использованы в дальнейших исследованиях *L.plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007) и *B.subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948).

Штаммы в дополнение к паспортным данным характеризовали по величине антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, чувствительности к действию желудочного сока и желчи; резистентности к действию часто применяемых в хозяйствах антибиотиков.

Установлен выраженный антагонизм штаммов бактерий в отношении патогенных микроорганизмов, причем штамм *B.subtilis* обладает более высокой антагонистической активностью, чем лактобактерии.

Лактобактерии данного штамма устойчивы к воздействию желчи и несколько меньше – желудочного сока. Снижение концентрации живых бактерий по сравнению с исходным значением составило $(0,6 \pm 0,2)$ lg КОЕ/см³ и $(1,7 \pm 0,3)$ lg КОЕ/см³ соответственно (n=5).

Показано (n=4), что лактобактерии высокочувствительны (диаметр зоны ЗР>25мм) к кламоксилу, левомицетину, тетрациклину, цефазолину, ампициллину и рифампицину; чувствительны (15-25 мм) к гентамицину; умеренно чувствительны (11-15мм) к офлоксацину, ципрофлоксацину, энрофлону, линкомицину и флавомицину.

Определена концентрация бактерий *B.subtilis* после контакта с желудочным соком и желчью, которая составила $(8,6 \pm 0,3)$ lg КОЕ/см³ и $(7,8 \pm 0,2)$ lg КОЕ/см³ соответственно при исходном значении $(9,1 \pm 0,3)$ lg КОЕ/см³, что свидетельствовало об устойчивости к желудочному соку и несколько большей чувствительности к желчи.

Антибиотикорезистентность бактерий *B.subtilis* выше, чем у бактерий *L.plantarum*, что может объясняться способностью бактерий *B.subtilis* к спорообразованию, которое при наших условиях культивирования составляет не менее 50%.

С учетом результатов исследований, проведенных в 2020 и предыдущих годах, предложена рецептура нового синбиотика, представляющего собой комплекс препаратов про- и пребиотиков.

В качестве *пробиотиков* выступают:

1) метабиотик, содержащий культуральную жидкость пробиотических микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, шт. 1К (ВКПМ № В-2991); *Lactobacillus plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007); *Bacillus subtilis*. штамм М-8 (ВКПМ № В-1948);

2) пробиотики на основе концентрированной биомассы пробиотических микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, шт. 1К (ВКПМ № В-2991); *Lactobacillus plantarum*, штамм 8РА3 (ВКПМ № В-11007); *Bacillus subtilis*, штамм М-8 (ВКПМ № В-1948).

В качестве *пребиотиков*:

1) биомасса и автолизат инактивированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae diastaticus*, штамм ВКПМ-γ-1218;

2) биомасса и культуральная жидкость высшего гриба *Fusarium sambucinum*, штамм МКФ 2001-3.

В целях разработки рациональных способов применения препаратов необходимо, чтобы они были в жидкой и сухой формах:

- в сухой форме клеточные пробиотики и пребиотики в виде инактивированной биомассы дрожжей и гриба;
- в жидкой форме метабиотики и пребиотики в виде культуральной жидкости и автолизатов дрожжей и гриба.

Жидкая форма про- и пребиотика обеспечивает возможность их выпивания с питьевой водой и/или другими жидкостями, которое является более технологичным способом по сравнению со скормливанием, а для новорожденных животных – единственно возможным.

Заключение. Полученные результаты способствуют развитию экологически безопасного производства и применения биопрепаратов, обеспечению эффективного животноводства и птицеводства.

Методологические подходы могут быть применены при исследовании других пробиотических микроорганизмов и препаратов на их основе.

Литература

1. Дуктов А.П. и др. Биополимеры, иммуностимуляторы и пробиотики в бройлерном птицеводстве: монография / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, Учреждение образования «Белорусская государственная сельскохозяйственная академия». – Горки: БГСХА, 2016. – 289 с.

2. Маркова Ю.М., Шевелёва С.А. Пробиотики как функциональные пищевые продукты: производство и подходы к оценке эффективности // Вопросы питания. - 2014. – Т. 83, № 4. - С. 4-14.
3. МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».
4. Самуйленко А.Я., Скотникова Т.А., Неминущая Л.А. и др. Инновационные биологически безопасные препараты для ветеринарии // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – № 2 – С. 45-46.
5. Araya M., Morelli L., Reid G. et al. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. – London, Ontario, Canada, 2002.
6. Hoffmann D.E., Fraser C.M., Palumbo F.B. et al. Probiotics: Finding the Right Regulatory Balance // Science (New York, NY). – 2013. – Vol. 342, N 6156. – P. 314–315.
7. Joint FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. – Cyrdoba, Argentina, Oct. 2001.

References

1. Biopolimery, immunostimulyatory i probiotiki v brojlerom pticevodstve : monografiya /A.P.Duktov [i dr.]; Ministerstvo sel'skogo hozyajstva i prodovol'stviya Respubliki Belarus', Glavnoe upravlenie obrazovaniya, nauki i kadrov, Uchrezhdenie obrazovaniya «Belorusskaya gosudarstvennaya sel'skohozyajstvennaya akademiya». – Gorki: BGSNA, 2016. – 289 p.
2. Markova YU.M. Probiotiki kak funkcional'nye pischevye produkty: proizvodstvo i podhody k ocnke effektivnosti / YU.M. Markova, S.A. Sheveleva // Voprosy pitaniya. - 2014. - Tom 83, № 4. - P. 4-14.
3. МУ 2.3.2.2789-10 «Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-epidemiologicheskoy ocnke bezopasnosti i funkcional'nogo potenciala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemykh dlya proizvodstva pischevykh produktov».
4. Samujlenko A.YA., Skotnikova T.A., Neminuschaya L.A. i dr. Innovacionnye biologicheski bezopasnye preparaty dlya veterinarii // Vestnik Rossijskij akademii sel'skohozyajstvennyh nauk. – 2014. – № 2 – P. 45-46.