

DOI 10.25741/2413-287X-2019-09-4-085

УДК 636.52 / .58.085.1

ПОЧЕМУ НЕ ВСЕ ПРОБИОТИКИ ОДИНАКОВО ПОЛЕЗНЫ

Е. ЙЫЛДЫРЫМ, Л. ИЛЬИНА, Н. НОВИКОВА, кандидаты биол. наук, **Е. БРАЖНИК, А. ДУБРОВИН, В. ФИЛИППОВА, Д. ТЮРИНА**, канд. экон. наук, **Г. ЛАПТЕВ**, д-р биол. наук, ООО «Биотроф»

E-mail: biotrof@biotrof.ru

В ходе проведенного в ООО «Биотроф» исследования был продемонстрирован различный уровень антимикробной активности у штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из различных источников, в отношении золотистого стафилококка и синегнойной палочки. Также показано, что штаммы *Bacillus sp.* имели различный уровень биодеструкции микотоксинов до безопасных соединений. Проведено полногеномное секвенирование двух штаммов микроорганизмов *Bacillus sp.* и *Enterococcus sp.* в составе пробиотика Профорт. В результате биоинформатической обработки выяснилось, что штаммы бактерий в пробиотике Профорт обладают рядом полезных свойств, придающих им более выраженную метаболическую активность по сравнению с аналогичными видами бактерий. Эти свойства включали способность к синтезу широкого спектра биологически активных веществ, в том числе аминокислот, витаминов, ферментов биодеструкции токсичных соединений, к формированию биопленок и др.

Ключевые слова: пробиотик Профорт, полногеномное секвенирование, биодеструкция микотоксинов.

Давно доказано, что состав микробиома животных и птицы нуждается в корректировке при помощи ввода в рацион штаммов полезных пробиотических бактерий. Нередко мы сталкиваемся с ситуацией, когда эффект от применения одних штаммов бактерий в составе пробиотиков используется как доказательство эффективности других штаммов того же вида. Это в корне неправильно, поскольку уровень эффективности биопрепарата полностью зависит от штамма, входящего в его состав, и не может экстраполироваться на весь вид, а тем более род, к которому он относится.

ВНУТРИВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ

Последние достижения в области молекулярной биологии привели к удивительным наблюдениям, главное из них — необыкновенная геномная изменчивость бактерий в рамках каждого конкретного вида в связи с высочайшей скоростью размножения этих микроорганизмов, способностью к горизонтальному переносу генов и быстрому накоплению значительного количества мутаций. Гаплоидность (наличие одинарного набора непарных хромосом) многих микроорганизмов обеспечивает проявление рецессивных мутаций,

In the course of a study conducted at «Biotrof» LLC, a different level of antimicrobial activity was demonstrated in *Bacillus subtilis* strains isolated from various sources in relation to *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Also shown that the strains of *Bacillus sp.* had a different level of biodegradation of mycotoxins to safe compounds. The full genome sequencing of two strains of *Bacillus sp.* and *Enterococcus sp.* in the composition of probiotic Profort was performed. As a result of bioinformatics processing, it turned out that the bacterial strains in probiof Profort have a number of very useful properties that give them much more pronounced metabolic activity compared to similar types of bacteria. These properties included the ability to synthesize a wide range of biologically active substances, including amino acids, vitamins, biodegradation enzymes of toxic compounds, the formation of biofilms, etc.

Keywords: probiotic Profort, full genome sequencing, mycotoxin biodegradation.

которые у диплоидных организмов могут быть «замаскированы» присутствием нормальной аллели.

Пожалуй, наибольшее внутривидовое разнообразие характерно для бацилл (*Bacillus*) — обширного рода, в составе которого насчитывается около 318 видов. Например, у различных штаммов бактерий в пределах одного вида *B. subtilis* лишь 70% генов сходны (консервативны), тогда как остальные 30% вариабельны и уникальны для каждого штамма.

Интересно, что консервативная часть генома — это гены, отвечающие за деление и рост клетки, синтез АТФ, нуклеиновых кислот и пр. А вот вариабельную его часть, то есть уникальную для каждого штамма, составляют именно те гены, которые напрямую связаны с пробиотической активностью: это гены синтеза антимикробных веществ, целлюлаз, витаминов и др. Они приобретены в результате так называемого горизонтального переноса вследствие необходимости адаптации бактерий к выживанию в разнообразных экологических условиях, которой сопутствует потребность конкурентного вытеснения микроорганизмов других групп, утилизации новых источников питательных веществ и пр.



ШТАММ ШТАММУ РОЗНЫ!

Очевидно, что гетерогенность геномов бактерий внутри вида обуславливает и разнообразие фенотипических признаков, то есть свойств.

Учитывая, что дисбактериоз кишечника сопровождается увеличением количества патогенных и условно-патогенных бактерий, микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, должны служить защитным барьером на пути проникновения патогенной микрофлоры. В связи с этим важным свойством пробиотических штаммов бактерий должна быть способность к антагонистической активности.

В качестве практической иллюстрации к сказанному можно привести следующий пример. На рисунке 1 представлен уровень антимикробной активности различных штаммов, принадлежащих к виду *Bacillus subtilis*, в отношении золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*) и синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*). Штаммы под условными номерами 1–7 были изолированы из различных природных источников, штамм №8 составляет основу пробиотика Целлобактерин-Т производства ООО «Биотроф».

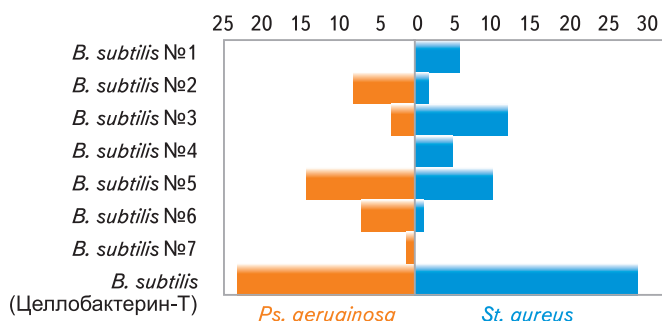


Рис. 1. Зона подавления роста патогенов, мм

Из восьми изученных штаммов выраженную эффективность в отношении патогенов проявил лишь один штамм бактерии *Bacillus subtilis* — входящий в состав пробиотика Целлобактерин-Т. Повышенная антагонистическая активность связана с продукцией специфических антимикробных факторов: органических кислот, бактериоцинов и др. Исследованные штаммы под условными номерами 1–7, несмотря на принадлежность к аналогичному виду бактерий, оказались малоактивными.

Как известно, корма на основе растительных компонентов могут загрязняться микотоксинами — ядами, производимыми плесневыми грибами. Доказано, что микотоксины у животных и птицы подавляют иммунную систему, нарушают работу кишечника, печени, почек, репродуктивной и нервной систем, пр. В связи с этим важным свойством штаммов бактерий в составе пробиотиков в последнее время принято считать способность к биодеструкции микотоксинов до безопасных соединений.

На рисунке 2 представлены результаты опыта по установлению уровня истинной биодеструкции микотоксинов

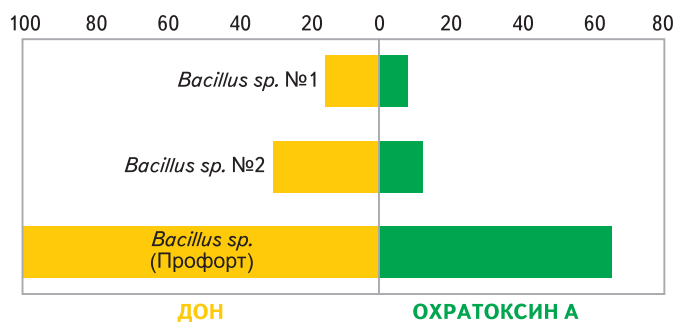


Рис. 2. Уровень биодеструкции микотоксинов, %

штаммами бактерий *Bacillus sp.*, который определяли как разницу между биодеструкцией живыми бактериальными клетками и сорбцией инактивированными клетками. Как видно, штамм бактерий в пробиотике **Профорт** эффективно разрушает молекулы токсинов по сравнению с другими исследованными штаммами (под условными номерами 1, 2). Это свидетельствует о том, у штамма бактерии *Bacillus sp.* в этом пробиотике уникальные ферментные комплексы, которые не представлены у других родственных бактерий и способны осуществлять биодеструкцию микотоксинов до безопасных соединений.

ДОКАЗАНО НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

В современных условиях штаммы бактерий в составе пробиотиков должны обладать целым комплексом полезных биотерапевтических свойств.

В научно-производственной компании «Биотроф» разработан ряд инновационных пробиотических препаратов, каждый из которых имеет масштабное научное досье, обосновывающее дифференцированное управление микробными представителями нормофлоры и другие полезные свойства. В результате многолетней работы у нее появилась новинка — многокомпонентный пробиотик Профорт на основе двух штаммов микроорганизмов *Bacillus sp.* и *Enterococcus sp.* Данные многочисленных опытов, проведенных на животных и птице, доказали безусловную эффективность применения биопрепарата.

Благодаря деятельности ученых центра молекулярно-генетических исследований компании «Биотроф» был разработан инновационный метод полногеномного секвенирования штаммов бактерий в составе биопрепаратов, который позволяет на молекулярном уровне оценить их свойства, механизмы действия и биологический потенциал. Процесс создания таких метаболических карт может приводить к важным результатам уже на этапе разработки биопрепарата. Кроме того, исследователь может оценить весь спектр возможностей и конкурентоспособность пробиотических бактерий при попадании в кишечник хозяина.

Филогенетический анализ штаммов бактерий в составе пробиотика Профорт выявил уникальность метаболических возможностей данных микроорганизмов по срав-

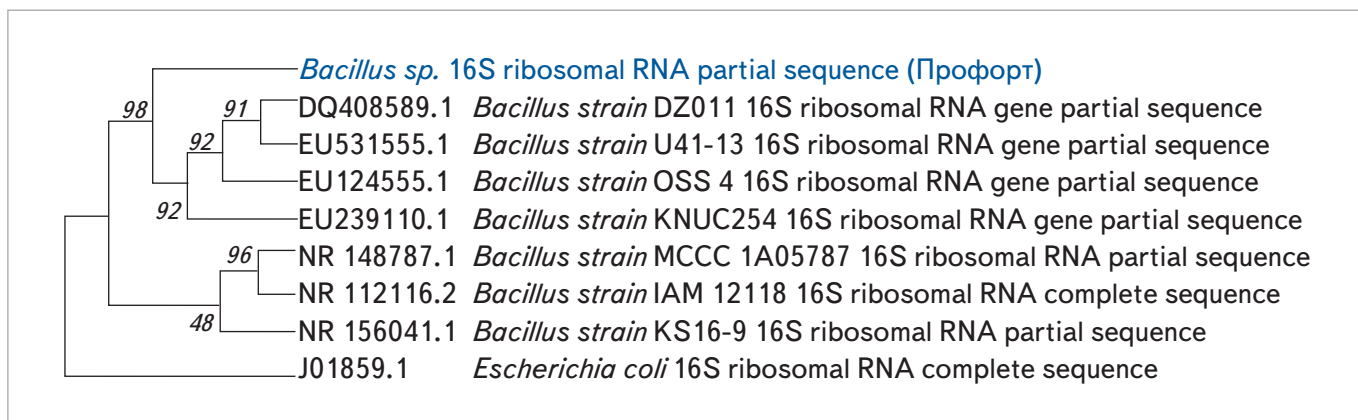


Рис. 3. Филогенетический анализ штамма бактерии *Bacillus sp.*

нению с аналогичными видами бактерий. На рисунке 3 в качестве примера показана степень филогенетической близости штамма *Bacillus sp.* в Профорте к геномам родственных микроорганизмов. Между штаммом бактерии в составе биопрепарата и другими микроорганизмами того же вида были обнаружены значительные различия в составе геномов и, следовательно, уникальность путей метаболизма. Как отмечено выше, такое геномное разнообразие у штаммов бактерий в составе пробиотика Профорт могло появиться в результате мутаций и горизонтального переноса генов между микроорганизмами.

В результате биоинформатической обработки с использованием базы данных «KEGG» выяснилось, что штаммы бактерий в составе пробиотика Профорт обладают рядом весьма полезных свойств, придающих им более выраженную метаболическую активность по сравнению с аналогичными видами бактерий.

В клетках *Bacillus sp.* и *Enterococcus sp.* в составе пробиотика Профорт имеется ряд ферментов, участвующих в биосинтезе важнейших соединений: аминокислот, в том числе незаменимых, витаминов, органических кислот,

бактериоцинов и др. (рис. 4). Например, цистеин и метионин, образуемые *Enterococcus sp.*, являются лимитирующими для птицы, а лизин — для коров и свиней, поскольку в составе рационов наиболее часто наблюдается дефицит этих аминокислот. Преимуществом микробного синтеза аминокислот перед химическим является способность бактерий образовывать эти вещества в биологически активной L-форме.

Особое значение имеет непотеиногенная γ -аминомасляная кислота, продуцируемая *Bacillus sp.*, которая принимает участие в нейромедиаторных и метаболических процессах. Например, в промышленном птицеводстве ее активно применяют в качестве адаптогена, в том числе для профилактики каннибализма, повышения резистентности организма, нормализации нейрогуморального статуса.

Одними из важнейших продуктов бактериального синтеза являются такие соединения, как органические кислоты, значение которых для организма животных и птицы чрезвычайно важно. Штаммы бактерий *Bacillus sp.* и *Enterococcus sp.* в составе пробиотика Профорт позволяют вырабатывать достаточное количество указанных соединений, об-

BACILLUS SP.		ENTEROCOCCUS SP.	
1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ глицин серин треонин гистидин фенилаланин триптофан валин лейцин изолейцин	5. СИНТЕЗ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ янтарная фумаровая масляная	1. СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ лизин цистеин метионин аргинин	
2. СИНТЕЗ γ-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ	6. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ рибофлавин фолиевая кислота ретинол пантотеновая кислота	2. ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ с антимикробными свойствами	
3. СИНТЕЗ БАКТЕРИОЦИНОВ из группы ансамицинов	7. КОЛОНИЗАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ биопленки жгутики защитные полисахариды	3. СИНТЕЗ ВИТАМИНОВ биотин тиамин	
4. СИНТЕЗ АНТИОКСИДАНТОВ		4. БИОДЕСТРУКЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ	

Рис. 4. Свойства штаммов в составе пробиотика Профорт

ладающих противовоспалительным действием, они защищают организм от патогенов и токсинов, поддерживают микробное равновесие и целостность слизистой кишечника. Так, бутират, образуемый *Bacillus sp.*, стимулирует обновление клеток слизистой кишечника — рост и пролиферацию энтероцитов, крипт, влияет на кровоток в слизистой и является основным энергетическим субстратом для клеток кишечника, обеспечивая до 70% потребности в энергии, а также участвует в регуляции многих метаболических и сигнальных процессов в ЖКТ.

Не менее ценное свойство бактерий в Профорте — способность образовывать витамины, например биотин, который играет важную роль во многих обменных процессах в организме. Многие животные и птицы — ауксотрофы по биотину. При его недостатке у цыплят и индюшат возникают депрессии роста, дерматиты на конечностях, в области головы, век, углов клюва; встречаются случаи перозиса. Нехватка биотина у коров сказывается в первую очередь на состоянии копыт, вызывая различные заболевания, которые приводят к хромоте и даже выбраковке животного.

Кроме того, в составе генома штамма *Bacillus sp.* обнаружено много генов, связанных с синтезом ансамициновых бактериоцинов, которые эффективны против многих грамположительных и грамотрицательных патогенов. В составе его генома также присутствуют гены синтеза глутатиона — одного из важных компонентов антиоксидантной защиты у птицы, препятствующей повреждению биологических молекул и гибели клеток в результате действия свободных радикалов.

Штаммы бактерий в составе Профорта обладают крайне высоким потенциалом в биодеградации токсичных соединений, что объясняет их активную способность разрушать микотоксины в кормах. Интересно, что у штамма *Bacillus sp.* был выявлен целый набор специфических генов, благодаря которым он способен адаптироваться, выживать и эффективно увеличивать численность в условиях ЖКТ животных и птицы. Выяснилось, что выстилать

и колонизировать поверхность слизистой кишечника штамму позволяет способность формировать биопленки, устойчивые к агрессивным факторам внешней среды. Эта способность определяется выраженными свойствами к адгезии благодаря наличию различных поверхностных структур: жгутиков, пилей и белков наружной мембраны. После завершения адгезии бактерии начинают активно выделять экзополисахариды, заполняющие межклеточное пространство, что обеспечивает устойчивость к действию повреждающих физико-химических факторов.

Таким образом, огромный выбор кормовых добавок отечественного и зарубежного производства, влияющих на микрофлору кишечника животных и птицы, ставит перед потребителями проблему рационального выбора наиболее эффективных препаратов. Следует помнить, что для микроорганизмов свойственна высокая генетическая гетерогенность, в связи с чем их биологическая активность крайне специфична и полностью зависит от штамма. Совершенно очевидно, что в качестве пробиотиков должны применяться препараты, полученные в результате длительной селекционной работы и имеющие доказанный широкий спектр физиологических эффектов. Как показали результаты исследований, в том числе полученные с использованием молекулярно-биологического инструментария, по своим характеристикам инновационные пробиотики производства ООО «Биотроф» отвечают всем современным требованиям.

Литература

1. *Квитко, К. В.* Генетика микроорганизмов : учеб. пособие / К. В. Квитко, И. А. Захаров. — СПб., 2012. — 269 с.
2. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep / A. Lettat [et al.] // BMC Microbiol. — 2012. — № 12. — 142 p.
3. *Uyeno, Y.* Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity / Y. Uyeno, S. Shigemori, T. Shimamoto // Microbes environ. — 2015. — № 30 (2). — P. 126–132. ■