

DOI 10.25741/2413-287X-2018-12-4-040

УДК 619: 615. 9

# ПРОБИОТИКИ ПРИ МИКОТОКСИКОЗАХ: ЭНЗИМЫ — ГЛАВНЫЙ КРИТЕРИЙ

**С. ГУЛЮШИН** канд. биол. наук, **Е. ЕЛИЗАРОВА**, канд. с.-х. наук **А. ДОЛГОРУКОВА** канд. биол. наук,

ФНЦ ВНИТИП РАН

E-mail: micotox@mail.ru

*В исследованиях выявлена высокая связь между чувствительностью бактерий к микотоксинам и активностью их ферментных комплексов, отвечающих за деструкцию ксенобиотиков. Таким образом, биохимическую оценку штаммов по активности окислительных энзимов можно использовать как маркерный признак у сильных форм.*

*Предложенный в исследованиях экспресс-тест по оценке зоны обесцвечивания резазурина тесно коррелирует с активностью ферментных комплексов, что позволяет наглядно и в сжатые сроки выявлять перспективные формы, а также направленно применять такие пробиотические препараты в профилактике кормовых отравлений, вызванных микотоксинами.*

Ключевые слова: микотоксины, пробиотические препараты, лактобациллы, окислительная деструкция, биodeградация, ферменты, T-2 токсин, афлатоксин B1.

Использование пробиотических препаратов при микотоксикозах — перспективный способ профилактики кормовых отравлений, который начинает активно применяться в современном птицеводстве и не уступает по эффективности традиционным приемам. В основе этого метода лежит свойство живых бактерий не только связывать часть токсинов в пищеварительном тракте, но и биохимически модифицировать их до менее опасных соединений. Таким образом, перенос нагрузки обезвреживания ксенобиотиков из организма птицы на микробную биомассу и снижение их концентрации в целом являются залогом для восстановления продуктивности в случае вынужденного использования недоброкачественных кормов. При этом позитивный эффект от применения пробиотиков может лишь усиливаться при наличии у бактерий иных полезных свойств (синтез витаминов и активных веществ, антагонизм в отношении болезнетворных бактерий, стимулирование иммунитета и др.).

В пищеварительном тракте симбиотическая микрофлора имеет оптимальные условия для жизнедеятельности, включая благоприятную температуру и кислотность среды, постоянный доступ к питательным и биологически активным веществам, а элементы саморегуляции позволяют ей обеспечивать устойчивые симбиотические,

*The research revealed the strong correlation between sensibility to mycotoxins and activity of the enzymatic complexes related to the destruction of xenobiotics in bacterial species. Therefore, biochemical assessments of the activity of oxidative enzymes can be used as a marker trait for the most active detoxifier strains.*

*The express test is proposed with the use of strong correlation between the activity of the enzymatic complexes and the area of discoloration of resazurin. The test allows for the fast and vivid detection of the prospective forms of bacterial detoxifiers and for the targeted application of these probiotic strains for the prevention of toxic effects of mycotoxin-contaminated feeds.*

Keywords: mycotoxins, probiotics, lactobacilli, oxidative destruction, biodegradation, enzymes, T2 toxin, aflatoxin B1.

антагонистические и другие взаимодействия, поддерживающие природный баланс. Кроме того, благодаря селективному давлению содержимого кишечника происходит постоянный естественный отбор микроорганизмов, идущий сразу по нескольким направлениям. В этом ключе нельзя забывать и об активности ферментных комплексов микробной клетки, которые предопределяют морфологические свойства живой клетки и обуславливают способность биотрансформации широкого спектра ксенобиотиков, в том числе микотоксинов.

Современные литературные данные утверждают, что обменные процессы в органеллах лактобацилл (окисление, конъюгация) во многом идентичны ферментным реакциям соответствующих фаз детоксикации у высших животных, поэтому принципиальная схожесть метаболизма способствует выживанию многих штаммов в ходе преобразования чужеродных веществ до менее токсичных соединений. Решающую роль здесь играют ферментные комплексы оксидоредуктазного спектра.

Результаты научных исследований, проведенных нами в 2016–2017 гг., показали практическую возможность выявления и создания активных форм молочнокислых бактерий с высоким потенциалом инактивации микотоксинов. Указанные штаммы отличает не только способность роста

в агрессивной среде, но и повышенная биотрансформация токсических метаболитов. В этом их преимущество перед обычными формами, не прошедшими предварительный отбор. То есть, вопросы качества самих пробиотических препаратов здесь выходят на первое место.

В контексте профилактики кормовых отравлений вопрос адекватности оценок микроорганизмов по устойчивости к микотоксинам приобретает особое значение. Однако если до недавнего времени аналогичные исследования проводились лишь путем изучения интенсивности роста культур в агрессивной среде, то с развитием наук биологического профиля появилась возможность заглянуть вглубь обменных процессов в клетке. Разработка новых критериев и использование информативных биомаркеров на основе активности энзимов являются важной задачей, решение которой было продолжено в лаборатории микотоксикологии ФНЦ ВНИТИП РАН.

Цель нового исследования, проведенного с использованием как обычных (слабых), так и заведомо сильных по отношению к микотоксинам штаммов лактобактерий, — оценить их по активности окислительных ферментов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков в клетке, и установить взаимосвязь с морфологическими признаками роста культур на агрессивных средах.

Результаты опытов показали, что тестируемые микроорганизмы (28 видов) демонстрировали широкий диапазон колебаний по биохимическим параметрам, причем различия в активности цитохром Р-450-зависимых оксидаз, дегидрогеназ и пероксидаз у контрастных (min—max) форм достигали значений в 360—1370 раз и находились в прямой зависимости от степени толерантности тестируемых микроорганизмов к токсинам ( $r = 0,75-0,93$ ). То есть максимально устойчивые формы имели высокий и узконаправленный характер течения окислительной ферментации.

Таким образом, обнаруженные ранее морфологические различия у лактобацилл являются следствием не внешних факторов, а в большей мере детерминируются внутренними обстоятельствами, что повышает ценность исследований такого рода. Такой неспецифический признак, как активность окислительных ферментов, можно использовать в качестве информативного теста для оценки их способности биодеградировать и противостоять токсическим метаболитам грибной микрофлоры. Активность энзимов как визитная карточка того или иного штамма позволяет существенно упростить процедуру оценки (бонитировки) биологического объекта по искомому свойству, облегчая и дополняя трудоемкие этапы первичного отбора.

Как уже отмечалось, в ходе опыта активность разных окислительных ферментов тесно коррелировала между собой ( $r = +0,63-0,71$ ), однако максимальное увеличение было зафиксировано для цитохрома Р-450, а далее для пероксидаз и дегидрогеназ (в порядке убывания). Таким образом, в деструкцию Т-2 токсина и афлатоксина В1 большой вклад вносит монооксигеназная активность. В будущем,

с развитием генно-инженерных технологий, это позволит запрограммировать микроорганизмы для направленной нейтрализации того или иного токсина (группы токсинов).

Вместе с тем, наряду с приведенными выше оценками, нами были проведены несколько исследований, связанных с установлением активности ферментов, непосредственно участвующих в детоксикации ксенобиотиков, роль которых в преобразовании чужеродных для организма веществ является решающей. Результаты исследований обнаружили сопряженный характер связи между эпоксидгидролазами, лактондегидрогеназами, УДФ-гликозилтрансферазами и комплексом окислительных энзимов. Дифференцированность и информативность «новых» ферментов оказалась выше. Так, из массива 28 штаммов была выявлена форма с явными превосходящими качествами. Другими словами, если такой антитоксический потенциал бактерий-лидеров еще только предстояло бы установить при выращивании на агрессивных средах, постепенно увеличивая концентрацию токсинов, то новые биомаркеры уже сейчас без труда выявили перспективный штамм, на основе которого целесообразно разрабатывать новые антитоксические добавки.

Несмотря на то что биохимические методы оценки довольно-таки трудоемки, а выполнение многих из них проблематично организовать в обычных условиях, результаты, полученные на их основе, очень информативны. С целью выявления перспективных пробиотических препаратов для большинства зооветеринарных лабораторий можно рекомендовать простой тест, выполненный по аналогии с оценкой чувствительности к антибиотикам. Работы такого рода не требуют высоких профессиональных навыков, но позволяют в сжатые сроки оценить устойчивость многих штаммов к различным ингибиторам роста.

Предполагается, что микотоксины диффундируют в агар, повышают локальную концентрацию ксенобиотика в нем, что является предпосылкой для подавления роста бактерий на поверхности. Однако результат учитывают здесь не по появлению круговой области просветления (зоны лизиса), а по интенсивности обесцвечивания индикатора резазурина, предварительно введенного в плотную питательную среду. Таким образом, по характеру изменения окраски можно косвенно оценить уровень микробной ферментации, интерпретируемый в качестве признака жизни (выживания). Другими словами, на самых ранних стадиях (через 5—6 ч) наглядно видны устойчивые к токсинам бактерии, причем этот результат фиксируется до начала фазы активного роста колоний, который заметен невооруженным взглядом. Результаты сравнительного исследования показали, что «слабые» формы имели интенсивно красную зону вокруг лунки (свыше 25 мм). В отличие от них «сильные» штаммы, беспрепятственно растущие в агрессивных условиях, легко обесцвечивали редокс-индикатор, оставляя лишь небольшой (0,1 мм) «поясок» вокруг кромки прямого контакта с токсинами.

Между устойчивостью бактерий к токсинам и характером обесцвечивания среды обнаружен стабильный тип связи ( $r = +0,58-0,63$ ), многократно подтвержденный в параллельных экспериментах. Все это позволяет использовать данный прием как простой и удобный в исполнении экспресс-тест. Несмотря на несколько меньшую его информативность по сравнению с прямой оценкой активности ферментов, сущность метода здесь также основана на течении ферментных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительным потенциалом культур, который обуславливает и деструкцию ксенобиотика, и темпы роста штаммов.

В заключении важно обратить особое внимание, что объективная и биологически обоснованная оценка симбиотических культур по устойчивости к микотоксинам, предопределяющим фактором которой является активность ферментов в живой клетке, — залог для создания специализированных антитоксических кормовых добавок и рационального их использования для профилактики кормовых отравлений.

При адекватном подходе это способно снизить остроту проблемы и повысить качественные характеристики продукции птицеводства, что в совокупности расширяет диапазон использования полезных пробиотических препаратов и существенно увеличивает рентабельность производства.

#### Литература

1. Ахременко, Я. А. Колонизационная резистентность — универсальный механизм противоинфекционной защиты / Я. А. Ахременко, О. П. Бочкарева, Е. П. Красноженов // Проблемы современной науки. — 2013. — № 7. — С. 104–115.
2. Индикация из ассоциированной микрофлоры птиц молочнокислых микроорганизмов, способных к деградации микотоксинов / Е. А. Горельникова [и др.] // Ветеринарный врач. — 2016. — № 1. — С. 6–10.
3. Микотоксины и продовольственная безопасность / О. И. Кальницкая [и др.] // Пищевая промышленность. — 2015. — № 9. — С. 14–15.
4. Климко, А. И. Пробиотические свойства молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* / А. И. Климко, Т. А. Чердынцева, А. Л. Брюханов // Тезисы докладов XII конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии». — М., 2017. — С. 52–54.
5. Молекулярные и генетические механизмы биотрансформации ксенобиотиков / М. И. Чурносков [и др.] // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. — 2011. — Том 15. — № 16. — С. 223–228.
6. Bzducha-Wrobel, A. *In vitro* and *in vivo* mycotoxin binding through the bacteria of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species / A. Bzducha-Wrobel, M. Gniewosz, A. Chlebowska-Smigiel // Med. weter. — 2015. — Vol. 71. — № 12. — P. 748–757. ■