

УДК 636.5.084.52

УСТОЙЧИВОСТЬ ЛАКТОБАКТЕРИЙ К АФЛАТОКСИНУ В₁

Гулюшин С. Ю., к. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории микотоксикологии,
Елизарова Е. В., к. с.-х. н., старший научный сотрудник лаборатории микотоксикологии
(ФНЦ ВНИТИП РАН)

Ключевые слова: микотоксины, афлатоксин В₁, пробиотики, лактоба-циллы, биодеградация. **Keywords:** mycotoxins, aflatoxin В₁, probiotics, lactobacillus, biodegradation.

РЕФЕРАТ

Исследование проводили в лаборатории микотоксикологии, где вторичную коллекцию молочнокислых микроорганизмов, отличающихся толерантностью к микотоксинам и имеющих определенный набор ферментных возможностей детоксикации, культивировали на средах с заведомо высоким содержанием афлатоксина В₁. Параллельно с этим проводили закрепление свойства деструкции афлатоксина В₁ методом накопительной селекции под контролем энзимов окислительной деградации метаболитов.

В результате проделанной работы удалось выявить два штамма лактоба-цилл, устойчивых к афлатоксину В₁. Дальнейшее подтверждение морфологических и хозяйственно-полезных свойств данных штаммов позволит создать на их основе новые специализированные анти-токсические препараты, востребованные для нужд практического животноводства.

Вместе с тем, такие эксперименты должны быть продолжены. Предметом углубленного изучения здесь могут явиться другие виды бактерий, а также другие микотоксины, как ксенобиотики, представляющие не менее серьезную опасность для промышленного птицеводства. Не менее перспективным направлением является и уточнение режима применения таких средств – должен ли это один быть универсальный моноштаммовый препарат, активный в широком диапазоне доз и видов токсичности, или для каждого ситуативного уровня потенциально должна быть «закреплена» своя форма бактерий, комбинированная в комплексный препарат.

В целом же, становится ясно уже сейчас, что перспективность использования бактерий для деструкции микотоксинов в кишечнике биологически обоснована и не вызывает сомнений, поскольку имеет ряд преимуществ перед традиционными способами профилактики.

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы рационального использования живых микроорганизмов в практике кормления с.-х. животных и птицы широко обсуждаются в научной литературе. Не менее важный аспект их применения – профилактика микотоксикозов, поскольку включение в загрязненный корм пробиотических препаратов способствует биодеградации токсических агентов бактериальными клетками, снижению их негативного эффекта на организм и улучшению общего состояния

животных при вынужденном скармливании недоброкачественных кормов.

Проведенные исследования показали, что далеко не все формы симбиотической микрофлоры в равной степени эффективно справляются с указанной задачей. Приоритет здесь, конечно же, нужно отдать факультивно-аэробным видам, имеющих более активные механизмы окисления различных метаболитов. Кроме того, необходимо обращать внимание и на культуральные свойства того или иного штамма, т.к. из всей сово-

купности, например, молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* лишь 5-10 % популяции имеют соответствующий порог чувствительности, позволяющий толерантно расти в агрессивных средах; остальные формы, как правило, погибают. Тем не менее, в Лаборатории микотоксикологии имеются высокоактивные штаммы лакто-бацилл способные утилизировать смесь микотоксинов в концентрации до 5 ПДК, что само по себе хотя и не мало, но и не много.

Учитывая системный характер в разработке биопрепаратов, вполне очевидно, что предлагаемые средства должны иметь более высокий потенциал инактивации токсинов, гарантирующие положительный эффект в широком диапазоне доз. Таким образом, выявление штаммов, способных расти в токсичной среде на уровне не менее 10-15 ПДК, является актуальной и вполне решаемой практической задачей с точки зрения профилактики кормовых отравлений.

С другой стороны, также необходимо обращать внимание на вид токсина: проведенные мониторинговые исследования показали, что афлатоксины обнаруживаются в большинстве образцов кормового сырья в дозах, способных вызвать негативный эффект у с.-х. животных.

Из всех типов микотоксинов, идентифицированных начиная с 1960 г., афлатоксинам посвящено больше исследований ввиду их высокой токсичности, канцерогенности и тератогенности. Афлатоксины (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) являются структурно-родственными соединениями, однако наиболее опасным из них является афлатоксин B_1 . Другие афлатоксины (B_2 , G_1 , G_2) менее токсичны и в природных условиях накапливаются реже [5, 6].

Все животные чувствительны к афлатоксину B_1 . Среди с.-х. птицы наиболее восприимчивым к нему являются утки и гуси, особенно молодняк (LD_{50} составляет 0,3-0,6 мг/кг), но и цыплята, фазаны, перепела также подвержены афлатоксикозам, хотя они несколько более устойчивы к ним (LD_{50} – 6,5-16,0 мг/кг жи-

вой массы). Для молодняка птицы содержание токсина в корме не должно превышать более 1 мг/кг [1, 3].

Хронический афлатоксикоз характеризуется поражением печени. Кро-воизлияния на поджелудочной железе и почках наряду с катаральными энтеритами и дуоденитами, а также расширением железистого желудка, являются наиболее характерными патологоанатомическими признаками отравления. Даже при незначительном уровне афлатоксина B_1 в кормах (1 мг/кг) дисфункция этих внутренних органов проявляется снижением эффективности использования питательных веществ, а глубокие нарушения в межклеточном обмене приводят к угнетению биосинтеза белка и отставанию в росте [2, 4].

В связи с вышеизложенным целью работы являлось оценить молочнокислые бактерии по способности роста в питательных средах с заведомо высокой концентрацией афлатоксина B_1 ; выделить и депонировать эти бактерии для последующей работы с ними.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования было протестировано 14 штаммов молочнокислых бактерий (*Lactobacillus*), прошедших тщательный предварительный отбор и отличающихся повышенной способностью роста на агрессивных средах с микотоксинами, чем в среднем по популяции.

На начальном этапе все бактерии были размножены чашечным методом. При этом питательные среды содержали повышенные концентрации микотоксина (от 3 ПДК) с тем расчетом, чтобы надёжно был подавлен рост «слабых» (спонтанно мутированных генотипов) изоформ лактобацилл, а на поверхности доминировали «сильные» представители данных популяций.

По истечении 1-2 суток инкубации при $t=37^{\circ}C$, когда на поверхности визуально не отмечалось снижение числа колоний, т.е. был подтвержден факт стабильного роста, производили забор выросших бактерий и из них готовили рабочие взвеси на физиологическом раство-

ре. Затем переходили к дальнейшим этапам, где концентрацию микотоксина в среде увеличивали на следующий шаг – 2 ПДК, и проводили аналогичные процедуры с выращиванием этих штаммов методом объемного посева. В качестве гипотезы предпологалось, что под негативным влиянием более высоких уровней афлатоксина В₁ часть бактерий неизбежно погибнет, а выживут лишь устойчивые формы.

Когда численность бактерий снова стабилизировалась (не уменьшалась) под влиянием новой концентрации афлатоксина В₁, её уровень поднимали на следующий шаг, и манипуляции по закреплению признака устойчивости повторяли вновь. Таким образом, общая продолжительность работы ограничивалась тем максимальным уровнем афлатоксина В₁ в среде, при котором физически смогла прорасти хоть одна колония лактобацилл, а саму эту выжившую форму считали новым устойчивым штаммом при условии сохранения традиционных свойств, характерных для большинства *Lactobacillus*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что культивирование 14 штаммов на средах с исходным (3 ПДК) содержанием афлатоксина В₁ показало удивительные параметры их роста (100 %).

При увеличении токсичности среды до 5 ПДК происходило отсеивание некоторых штаммов из числа препаратов, с которыми целесообразно проводить дальнейшую работу, что согласуется с логикой подобных исследований и основной рабочей гипотезой. В остальных случаях (12 шт.) наблюдалось лишь частичное снижение активности – от 30 до 80 % колоний были обезврежены бактерицидным эффектом данного поликетидного ксенобиотика. Однако последующее адаптивное выращивание выживших бактерий на аналогичных средах позволило выправить ситуацию, и большинство штаммов в целом оказалось пригодным для выполнения следующего этапа.

При концентрации среды 7 ПДК безвозвратно «потерялось» еще 3 штамма, которые качественно вырождались и утрачивали морфологические свойства. Концентрация афлатоксина В₁ в 9 ПДК способствовала гибели или выбраковке в общей сложности более 64 % препаратов от исходного количества культур, участвующих в опыте, а при 11 ПДК в работе объективно оставалось всего 4 популяции молочнокислых бактерий.

В условиях данной токсичности среды были проведены биохимические исследования, показавшие, что в бактериальных клетках активность ферментов детоксикации, оцененная по реакции восстановления резазурина в жидкой фазе, имела максимальный уровень (< 8 500 уе/г), при четком снижении амплитуды колебаний ($C_v < 5,2$ %). Другими словами, каждый из 4-х штаммов в этой ситуации был максимально ориентирован на метаболическую деструкцию повреждающего фактора, что подтверждается также достоверным снижением концентрации афлатоксина В₁ в данных средах.

В дальнейшем диапазон 11-13 ПДК обусловил гибель еще одного штамма, а в атмосфере токсичности 13-14,5 ПДК смогли выжить всего 2 культуры, но и они при возрастании концентрации свыше 14,5 ПДК не проявляли признаков роста, несмотря на интенсивное проведение адаптационных мероприятий (свыше 12-18 пассажей).

Таким образом, токсичность среды 14-15 ПДК является финишным значением для жизни лактобацилл, за пределами которого отмечается разобщение жизненных функций, метаболический хаос и смерть бактериальной клетки.

В порядке обсуждения полученных результатов нужно отметить, что текущие значения токсичности среды являются достаточно большими значениями, где практически невозможна жизнь нативных бактерий, выделенных из обычных пробиотиков. Причем, большое значение здесь принадлежит постоянному отбору, поскольку эффективность данных штаммов проявляется не сама по себе

(как «врожденная» черта ординарных форм), а сопровождается длительным периодом закрепления признака, являющимся обязательным элементом работ такого рода. Все это в совокупности явилось залогом получения прорывного результата как с позиций конкретных свойств лакто-бактерий, так и с точки зрения технологии их выделения.

ВЫВОДЫ

По результатам проведенного исследования выделены перспективные формы лактобацилл, способные расти в средах с высоким содержанием аф-латоксина В₁ и биологически разрушать его. Получение новых активных штаммов, устойчивых к микотоксинам, является залогом для создания специализированных антитоксических кормовых добавок и рационального их применения для сохранения продуктивности животных.

RESISTANCE of LACTOBACILLI to AFLATOXIN B₁. Galyushin S.Yu., Elisarova E.V.

ABSTRACT

The study was conducted in the laboratory of mycotoxicology, where a secondary collection of lactobacillus, characterized by tolerance to mycotoxins and having a certain set of enzyme detoxification capabilities, was cultured on agar medium with a notoriously high content of aflatoxin B₁. In parallel, the property of destruction of aflatoxin B₁ was fixed by the method of cumulative selection under the control of enzymes of oxidative degradation of metabolites.

In the result of this work, it was possible to identify two strains of lactobacilli resistant to aflatoxin B₁. Further confirmation of morphological and economic useful properties of these strains will allow to create on their basis new specialized antitoxic preparations demanded for needs of practical animal farming.

The experiments should be continued. The other bacterial species and other mycotoxins should be the subject of the further study as the xenobiotics potentially harmful for commercial poultry production. A promising direction of these study is the mode of application of these detoxifying agents:

whether it should be a single-strain preparation active in a wide range of doses and types of toxicity, or for each situational level its own bacterial strain should potentially be "fixed" and combined into a complex drug. However, the prospectivity of bacterial agents for the destruction of mycotoxins in the intestine is now clear and doubtless since this method has several important advantages compared to the traditional approaches to the prevention of mycotoxicoses.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брылин, А.П. Влияние микотоксинов на эпизоотическое благополучие, иммунитет и производство экологически безопасной продукции птицеводства / А.П. Брылин // Птицеводство. – 2019. - № 5. - С.57-64.
2. Джавахия, В.Г. Афлатоксины: ингибирование биосинтеза, профилактика загрязнения и деконтаминация агропродукции / В. Г. Джавахия, Н.В. Стацюк, Л.А. Щербакова, С.Б. Поплетаява. - Москва: Достижения науки и техники АПК, 2017. -- 159 с.
3. Иванов, А.В. Микотоксины / А.В. Иванов, В.И. Фисинин, М.Я. Трemasов, К.Х. Папуниди. - Москва: Росинформаротех, 2012. - 136 с.
4. Овчинников, Р.С. Микотоксины и микотоксикозы животных - актуальная проблема сельского хозяйства / Р.С. Овчинников, А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев, В.А. Савинов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2018. - № 1. - С.114-123.
5. Пинюгин, А.В. Справочник структур метаболитов микроскопических грибов / А.В. Пинюгин, О.М. Пинюгина, А.В. Шерстюк. - Кострома: Аванти-тул, 2018. - 639 с.
6. Yamasaki, T. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of total aflatoxins based on monoclonal antibody reactive with aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ / T. Yamasaki, S. Miyake, N. Sato, Y. Hirakawa, S. Iwasa, H. Narita, T. Watanabe // Food hygiene and safety science. – 2018. - Vol.59. - № 5. - P.200.