

УДК 615.28

**ПОИСК БАКТЕРИОЦИНОГЕННЫХ ШТАММОВ СРЕДИ ИНДИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ
МЯСА И ПЕРСПЕКТИВА ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТИВ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ.**

Е.В. Зайко, Д.С. Батаева

Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, Россия

В 1928 году британский бактериолог Александр Флеминг обнаружил пенициллин, первый в мире антибиотик [1]. С тех пор было открыто большое количество различных антибиотиков, которые широко использовались для лечения заболеваний в клинической медицине, спасая бесчисленное количество жизней [2]. Однако злоупотребление антибиотиками для лечения людей и бесконтрольное использование их в животноводстве привело к формированию полирезистентных штаммов бактерий. И как следствие этому, последнее десятилетие ознаменовалось мировой борьбой с распространением устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий, которые представляют опасность как для человека, так и для животных. Продукты питания являются одним из звеном в передачи микроорганизмов, в том числе устойчивых, к человеку.

Сопrotивление лекарственным средствам представляет серьезную угрозу для здоровья населения и безопасности пищевых продуктов и является главной проблемой современного общества. Поэтому необходима замена традиционных антибиотиков новыми противомикробными веществами, которые вызывают меньше побочных эффектов и к которым микроорганизмы менее склонны к резистентности. В настоящее время в качестве подходящей альтернативы рассматриваются применения некоторых бактериальных пептидов с антимикробным потенциалом. Среди них большое внимание уделяется бактериоцинам, благодаря их высоким терапевтическим показателям и нетоксичной природе. Одними из основных продуцентами бактериоцинов являются молочнокислые бактерии (LAB). Они встречаются в большинстве ферментированных продуктов как в качестве естественной микрофлоры, так и в качестве исходных культур, добавленных в процессе производства.

Будучи потенциальными ингибиторами различных патогенов и не вызывающими устойчивость у бактерий бактериоцины повысили интерес многочисленных ученых к работе в области создания лекарств на основе бактериоцинов [6].

Одним из вариантов компенсации недостатка новых антибиотиков является введение бактериоцинов в качестве терапевтических средств в клинической медицине. Бактериоцины являются синтезированными рибосомами антимикробными пептидами, продуцируемыми бактериями, и могут проявлять как узкий спектр активности (нацеленные на представителей одного и того же вида), так и более широкий спектр активности (нацеленные на другие виды и роды бактерий) (Cotter et al., 2013). Поэтому бактериоцины считаются перспективными альтернативами традиционным антибиотикам [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы штаммы молочнокислых бактерий, выделенные с поверхности туш КРС путем взятия смывов. Для этого смывы заливали MRS бульоном (Merck) и культивировали при температуре 30 °С в течение 48 часов. По истечении времени инкубации делали рассев на питательную среду MRS агар (Merck). Принадлежности выделенных бактерий к молочнокислым микроорганизмам проводили согласно ГОСТ 10444.11–2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы выявления и подсчета мезофильных молочнокислых микроорганизмов». Культуры, относящиеся к молочнокислым, исследовали на способность продуцировать бактериоцины.

Для оценки их бактериоциногенных свойств в качестве тест штамма использовали *Salmonella enteritidis*, проявляющую устойчивость к тетрациклину в концентрации 30 мкг. Для исследования потенциальной бактериоциногенности проводили исследования методом двухслойных агаров. В чашки Петри заливали слой полужидкого MRS агар, после застывания среды в неё вносили уколочную культуру МКБ в область полурадиуса чашки Петри. Чашки с посевами инкубировали при температуре (30 ± 2)°С в течение 3 сут для разрастания культуры и накопления бактериоцина в питательной среде. По истечении этого времени поверхность полужидкого агара MRS заливали тонкий слой мягкого питательного агара, зараженного целевым тест-штаммом. В качестве контрольного образца инкубировали зараженный патогеном мягкий питательный агар, залитый в стерильную чашку Петри. Чашки инкубировали при температуре (37 ± 2)°С в течение 24 часов (совместное культивирование), после чего проводили визуальную оценку ингибирования роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из отобранных смывов с туш КРС были выделены 36 культур, из которых только 14 штаммов по результатам идентификации были отнесены к молочнокислым бактериям и были отобраны для изучения их бактериоциногенности.

В результате исследования антагонистической активности 14 штаммов к *Salmonella enteritidis*, устойчивой к тетрациклину, были отобраны 2 штамма молочнокислых бактерий проявляющих наибольшую активность (рис. 1,2).

В дальнейшем штаммы, проявляющие наибольшую антимикробную активность были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum* (БЦ1) и *Lactobacillus brevis* (БЦ16).

Отобранные 2 штамма были исследованы на антимикробную активность к бактериям рода *Salmonella*, выделенным из пищевых продуктов и устойчивых к различным видам антибиотиков. Результаты представлены в таблице 1.



Рисунок 2. Чашки Петри с ростом целевого тест-штамма *Salmonella enteritidis* поверх роста МКБ: 1) рост колоний МКБ в MRS-агаре; 2) зона ингибирования роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара

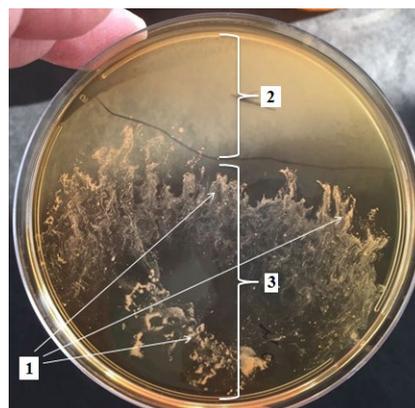


Рисунок 3. Чашки Петри с ростом *Salmonella enteritidis* поверх роста МКБ: 1) рост колоний МКБ в MRS-агаре; 2) зона сплошного роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара; 3) зона отсутствия роста целевого тест-штамма в верхнем слое агара

Таблица 1

Идентификация бактерий рода <i>Salmonella</i>	Фенотипический профиль устойчивости к антибиотикам	Зона ингибирования роста БЦ 1, мм	Зона ингибирования роста БЦ 16, мм
S1	Тетрациклин 30 мкг	8	7
S3	Бензилпенициллин 10 ЕД	10	8
S4	Амоксициллин 20 мкг	11	9
S5	Гентамицин 10 мкг	8	5
S6	Тетрациклин 30 мкг Амоксициллин 20 мкг	9	9
S7	Ципрофлоксацин 5 мкг	12	10

Таким образом, в результате проведенных исследований были отобраны штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* (БЦ1) и *Lactobacillus brevis* (БЦ 16) проявляющих антагонистическую активность как к монорезистентным штаммам бактерий рода *Salmonella*, так и к мультирезистентным штаммам.

ЛИТЕРАТУРА

- Guzman J.D. Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds // J.D. Guzman, A. Gupta, F. Bucar, S. Gibbons, S. Bhakta / *Frontiers in bioscience*. – 2012. – 17. – 1861–1881.
- Alharbi S.A. What if Fleming had not discovered penicillin? // S.A. Alharbi, M. Wainwright, T.A. Alahmadi, H.B. Salleh, A.A. Faden, A. Chinnathambi / *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2014. – 21(4). – 289–293.
- Батаева Д.С. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов // Д.С. Батаева, Е.В. Зайко / *Теория и практика переработки мяса*. – 2016. – 1(3). – 4–13.
- Blackburn P. In International Patent No. PCT/US89 / 02525 // J. Polak, S. Gusik, S.D. Rubino / International Publication no. W089 / 12399. – 1989. New York USA.
- Severina E. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens // E. Severina, A. Severin, A. Tomasz / *J. Antimicrob. Chemother.* – 1998. – 41. – 341–347.
- Cotter P.D. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics // P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill / *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – 2(11). – 95–105.
- Bastos M.C.F. Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications // M.C.F. Bastos, H. Ceotto, M.L.V. Coelho, J.S. Nascimento / *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2009. – 10. – 38–61.