

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ С ЛАКТОНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ЖИВОТНЫХ ОТ МИКОТОКСИНОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В КОРМАХ

¹Бриславский Я.А., ¹Празднова Е.В., ²Рудой Д.В., ²Ольшевская А.В., ²Одабашян М.Ю.,
²Пруцков А.С., ²Вершинина А.В.

¹Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия

²Донской государственной технической университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. В статье рассматриваются перспективы использования пробиотических микроорганизмов с лактоназой активностью, в частности, оценка этих микроорганизмов на предмет синтеза таких ферментов с лактоназой активностью, как ацил-гомосеринлактоназы (aiiA) и лакказы (cotA). Рассматривается участие данных ферментов в механизме разобщения кворума (Quorum Quenching, QQ). В ходе работы изучена распространенность двух ферментов с лактоназой активностью, на основе результатов выявлены наиболее перспективные штаммы, также подтверждена связь активности по подавлению свечения и наличия соответствующего гена. Наиболее перспективные из изученных штаммов можно применять для защиты животных от микотоксинов в кормах.

Ключевые слова. Bacillus, пробиотические микроорганизмы, микотоксины, чувство кворума, лактоназная активность.

USE OF PROBIOTIC BACTERIA WITH LACTONASE ACTIVITY TO PROTECT ANIMALS FROM MYCOTOXINS IN FEED

¹Brislavskiy Y.A., ¹Prazdnova E.V., ²Rudoy D.V., ²Olshetskaya A.V., ²Odabashyan M.Yu., ²Prutskov A.S., ²Vershinina A.V.

¹Southern Federal University, The Academy of Biology and Biotechnology named after D. I. Ivanovsky, Rostov-on-Don, Russian Federation

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Annotation. The article discusses the prospects for the use of probiotic microorganisms with lactonase activity, in particular, the evaluation of these microorganisms for the synthesis of such enzymes with lactonase activity as acyl homoserine lactonase (aiiA) and laccase (cotA). The participation of these enzymes in the mechanism of quorum quenching (Quorum Quenching, QQ) is considered. In the course of the work, the prevalence of two enzymes with lactonase activity was studied, based on the results, the most promising strains were identified, also confirmed the relationship of activity to suppress luminescence and the presence of the corresponding gene. The most promising of the studied strains can be used to protect animals from mycotoxins in feed.

Keywords. Bacillus, probiotic microorganisms, mycotoxins, quorum sensing, lactonase activity.

Микотоксины являются токсичными вторичными метаболитами, синтезируемыми плесневыми грибами, и оказывают неблагоприятное воздействие на человека и животных, что приводит к развитию различных заболеваний, известных как микотоксикозы. Микотоксины оказывают негативное влияние на аквакультуру и сельское хозяйство, попадая в корма, которые часто бывают растительного происхождения [1].

Токсины плесневых грибов, имеющие в своем составе лактоновое кольцо, могут разрушаться определенными ферментами (такие ферменты обладают лактоназой активностью). К ним относятся лакказа и АГЛ-лактоназа, рассматриваемые в данной работе [2,3]. Обширным набором различных практически значимых ферментов обладают пробиотические бациллы [4,5,6]. В том числе бациллы могут синтезировать искомые ферменты с лактоназой активностью.

Также исследуемые в работе ферменты принимают участие в процессах деградации сигнальных молекул микроорганизмов (разрушение лактонового кольца сигнальных молекул, в частности деградация ацилгомосеринлактона). Таким образом ферменты принимают участие в процессе подавления чувства кворума и тест на основе биосенсора, применяемые в работе, можно использовать

для подтверждения наличия подобных ферментов в дополнение к ПЦР [7]. Поиск штаммов, имеющих кворум-ингибирующие ферменты, довольно перспективен, так как само чувство кворума широко распространено среди микроорганизмов и его подавление имеет значительные последствия. Так, например, можно использовать ингибирование чувства кворума для противодействия патогенам растений и животных, использовать в борьбе с резистентностью патогенов к лекарственным препаратам, для противодействия биообрастания на очистных сооружениях [8,9].

Целью работы являлся поиск среди пробиотических микроорганизмов бактерий с лактоназой активностью. В частности, оценка этих микроорганизмов на предмет синтеза таких ферментов с лактоназой активностью, как ацил-гомосеринлактоназы (aiiA) и лакказы (cotA).

Материал данного исследования- микроорганизмы рода *Bacillus* (выделены из кормовой добавки «Целлобактерин», добавка используется для сельскохозяйственных животных), *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, *Bacillus amyloliquefaciens* V1895, ряд штаммов *Bacillus licheniformis*. Бактерии *Vibrio aquamarinus* использовались в данной работе в качестве биосенсора.

В таблице 1 представлены результаты ПЦР-анализа. Для детекции результатов использовался стандартный горизонтальный электрофорез в агарозном геле. В данной таблице, номера 1с, 2с, 3с, 4с – штаммы *Bacillus*, из кормовой добавки «Целлобактерин», другие номера в таблице- штаммы *Bacillus licheniformis*. Итак, ген синтеза АГЛ-лактоназы (aiiA) был найден у 10 штаммов (представлены в таблице) *Bacillus licheniformis* и Целлобактерин 4. Ген синтеза лакказы (cotA) был найден у одного штамма (№35) *Bacillus licheniformis*, и также у штамма Целлобактерин 1. У *Bacillus licheniformis* (по данным проведенного исследования) ген АГЛ-лактоназы оказался существенно более распространенным, чем ген лакказы, а у бацилл из кормовой добавки были найдены оба гена (однако в разных образцах).

Таблица 1 - Результаты электрофореза на исследуемые гены у штаммов *Bacillus*

№	aaiA (<i>B.cereus</i>)	aaiA (<i>B.thuringiensis</i>)	cotA (<i>B.subtilis</i>)	cotA (<i>B.pumilus</i>)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
14	-	-	-	-
17	+	-	-	-
18	+	-	-	-
20	+	-	-	-
22	-	-	-	-
25	+	-	-	-
26	+	-	-	-
28	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	+	-	-	-
35	-	-	-	+
36	-	-	-	-
50	+	-	-	-
51	+	-	-	-
53	+	-	-	-

56	+	-	-	-
1с	-	-	+	-
2с	-	-	-	-
3с	-	-	-	-
4с	-	+	-	-
B1895	+	+	+	-
Katmira	-	-	+	-

Так как на время начала работы видовая принадлежность штаммов микроорганизмов еще не была установлена, то были выбраны праймеры, гомологичные последовательностям распространенных представителей разных генетических групп *Bacillus* (*B.cereus*, *B.thuringiensis*, *B.pumilus*, *B.subtilis*).

После проведения ПЦР все исследуемые в работе штаммы бацилл были проверены на эффект подавления биолюминесценции (которая является маркером для QS и лактоназной активности (в данном случае)). Растили культуру бацилл на чашке Петри, на другой чашке (среда LB с сахарозой) в форме креста засеивалась *Vibrio aquamarinus*. Затем агаровый блок с бациллами помещали в центр культуры *Vibrio aquamarinus*. Метаболиты, выделяемые бациллами и попадающие в агар (в частности исследуемые ферменты- лактоназа и лакказа), подавляли люминесценцию *Vibrio aquamarinus*, так как этот процесс регулируется чувством кворума, а изучаемые в работе ферменты его подавляют. После постановки теста с культурой биосенсора и последующей оценки результатов были получены данные, которые представлены в таблице 2.

Наиболее значительный эффект в подавлении свечения продемонстрировали штаммы *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, Целлобактерин 3, Целлобактерин 2, *Bacillus subtilis* KATMIRA, из штаммов *Bacillus licheniformis* наибольшую активность показал штамм №35. По итогам тестирования активность в подавлении свечения наблюдалась у всех штаммов, выделенных из «Целлобактерина».

Таблица 2 - Зоны подавления свечения (в мм) *Vibrio aquamarinus*

Штамм <i>Bacillus</i>	Зона подавления свечения (мм)
B1895	13
Целлобактерин 3	8
Целлобактерин 2	6
Katmira	5
Целлобактерин 1	3
Целлобактерин 4	3
35	4
32	3
22	3
28	3
33	2
31	2
4	1
53	1
25	1

26	1
18	1
3	1
20	1
17	1

На основе результатов исследования можно сделать следующие выводы: в ходе работы изучена распространенность ферментов с лактоназной активностью, подавляющих также чувство кворума в исследуемой выборке микроорганизмов и подтверждена связь активности по подавлению свечения и наличия соответствующего гена. Поэтому эти штаммы могут иметь двойной положительный эффект, то есть как мешать проявляться патогенам за счет подавления чувства кворума патогенов, так и спасать от токсинов в корме. Использование данных штаммов может найти применение также в аквакультуре и является перспективным.

Список использованных источников

1. Anater A., Manyes L., Meca G., Ferrer E., Luciano F.B., Pimpão C.T., Font G. Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review//Aquaculture, 2016, Vol. 451, Mycotoxins and their consequences in aquaculture, P. 1-10.
2. Enguita F.J., Martins L.O., Henriques A.O., Carrondo M.A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties // The Journal of Biological Chemistry. – 2003. -V. 278, N 21. - P. 19416-19425.
3. Liu D., Momb J., Thomas P.W., Moulin A., Petsko G.A., Fast W., Ringe D. Mechanism of the Quorum-Quenching Lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. Product-Bound Structures // Biochemistry. – 2008. - V. 47, N 29. - P. 7706-7714.
4. Ming L.-J., Epperson J.D. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2002. - V. 91, N 1. - P. 46-58.
5. Сатторов Н.Р. Разработка технологии производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и их эффективность при инфекционных энтеритах телят. – Казань, 2013. – 250 с.
6. Tazehabadi M.H., Algburi A., Popov I.V., Ermakov A.M., Chistyakov V.A., Prazdnova E.V., Weeks R., Chikindas M.L. Probiotic Bacilli inhibit *Salmonella* biofilm formation without killing planktonic cells // Frontiers in Microbiology. – 2021. - V. 12. - P. 242.
7. Anandan K., Vittal R.R. Quorum quenching activity of AiiA lactonase KMMI17 from endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 on AHL- mediated pathogenic phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbial Pathogenesis. – 2019. - V. 132. - P. 230-242.
8. Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2000. - V. 97, N 7. - P. 3526-3531.
9. Oh H.-S., Yeon K.-M., Yang C.-S., Kim S.-R., Lee C.-H., Park S.Y., Han J.Y., Lee J.-K. Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum quenching bacteria encapsulated in microporous membrane // Environmental Science & Technology. – 2012. - V. 46, N 9. - P. 4877-4884.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания (Южный федеральный университет, проект № 0852-2020-0029); Работа выполнена в рамках соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации от 01.06.2022 г. №075-15-2022-1045 и исследование выполнено при поддержке гранта в рамках конкурса «Наука-2030».