

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГОМОПРОБИОТИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

И.А. Гнеушева

к.т.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина (г. Орёл, Россия)
E-mail: obc1-2010@mail.ru

И.Ю. Солохина

к.б.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина (г. Орёл, Россия)
E-mail: solohinairina@yandex.ru

Для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний животных актуальным направлением является применение пробиотиков, в составе которых штаммы *Lactobacillus spp.*

Цель исследования. Изучение биологических свойств новых гомопробиотических изолятов лактобактерий, выделенных из кишечного содержимого здоровых поросят-отъемышей, с отбором перспективного продуцента для создания пробиотического препарата.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали 12 изолятов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечного содержимого 23 здоровых животных. Положительным контролем послужил гомопробиотический штамм *L. acidophilus* ЛГ-1-ДЕП-ВГНКИ, выделенный из пробиотического препарата «Лактобифадол форте» (ООО БФ «Компонент»). Лактобактерии выращивали в глубинной культуре на кукурузно-лактозной среде. Протеолитическую активность определяли в клеточных экстрактах, разрушенных ультразвуком. Исследования адгезивных свойств проводили с помощью метода фотоколориметрии, уровень кислотообразования – по методике Тернера. Антагонистические свойства штаммов лактобацилл исследовали диффузным методом *in vitro*, используя в качестве тест-объекта штаммы *Enterobacteriaceae* из кишечного содержимого поросят-отъемышей с гастроэнтеритом, *Escherichia coli* (типичная), *E. coli* (лактозонегативная), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas ruginosa*, *Staphylococcus aureus*, а в качестве тест-штамма использовали *E. coli* С 600. Антибиотикорезистентность определяли методом серийных разведений с определением минимальной подавляющей концентрации.

Результаты. Установлено, что наиболее эффективную протеолитическую и гликолитическую активность проявляли изоляты под номерами 3,7,10 и контрольный штамм. Высокий уровень адгезивной активности и кислотообразования проявил изолят номер 7, который обладает выраженной антагонистической активностью, о чем свидетельствует величина диаметра зоны задержки роста тест-штамма вокруг агарового блока на 10–23% по отношению к контролю. При исследовании антибиотикорезистентности изолята под номером 7 выявлено, что изолят чувствителен к ампициллину, цефатоксиму, цефиксиму, меропинему, канамицину. Видовая принадлежность изолята – *L. paracasei*.

Выводы. Гомопробиотический изолят *L. paracasei* и сочетание данного изолята с пробиотическим штаммом *L. acidophilus* ЛГ-1-ДЕП-ВГНКИ можно рекомендовать для включения в состав пробиотической продукции ветеринарного назначения.

Ключевые слова: *Lactobacillus spp.*, пробиотические микроорганизмы, пробиотические препараты, микробный консорциум, биопродукция.

Для цитирования: Гнеушева И.А., Солохина И.Ю. Биологические свойства гомопробиотических изолятов лактобактерий – перспективных продуцентов пробиотических препаратов. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(6):10–18. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-02>

Основной функцией представителей молочно-кислых бактерий, индигенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, включаемых в состав пробиотических препаратов, является их участие в обмене веществ микроорганизма, а также защита от проникновения инфекции извне [1]. Регуляция обменных процессов пробиотическими микроорганизмами возможна благодаря продукции различных биологически активных соединений, среди которых особый интерес представляют ферменты [2, 3].

Для разработки новых препаратов пробиотического действия постоянно ведется поиск активных штаммов, отбор которых осуществляется по общепринятым в этой области исследований критериям: ферментативная активность биообъекта, активное кислотообразование, высокая антагонистическая и адгезивная активность, устойчивость к антибиотикам [4–6]. Последнее связано с тем, что пробиотические микроорганизмы в большинстве своём чувствительны к некоторым широко применяющимся в

клинической практике антибактериальными препаратами, поэтому их использование совместно с антибиотиками считается неоправданным [7, 8].

В настоящее время для клиницистов и исследователей в сфере медицинского и ветеринарного применения препаратов-пробиотиков одной из актуальных тем является обоснованность и эффективность одномоментного приема пробиотических препаратов с антибиотическими в процессе целевой антимикробной терапии. При этом учитывается, что эффективность комплексной терапии повышается в том случае, если и пробиотический штамм, и антибиотик являются синергистами, так как их совместное действие снижает частоту появления побочных эффектов этиотропной терапии и повышает эффективность эрадикационной. Доказано, что совместное применение антибиотиков и пробиотиков позволяет снизить риск развития дисбактериоза или уменьшить его тяжесть [9].

Повышение эффективности и расширение спектра биологической активности лактосодержащих пробиотических микроорганизмов может быть достигнуто за счет разработки комплексных препаратов для фармации и ветеринарии на основе специально подобранных бактериальных композиций, включающих в себя совместимые и взаимодополняющие штаммы, выделенные из желудочно-кишечных трактов здоровых людей и животных [10, 11].

Многими исследователями показана актуальность создания метабиотиков – препаратов нового поколения для управления микрофлорой толстой кишки как экосистемой и метаболическим органом. Они перспективны для коррекции различных функциональных нарушений органов и систем, возникающих вследствие дисбиоза [12, 13].

Активные метаболиты метабиотиков обладают комплексом положительных эффектов: антибактериальные свойства позволяют бороться с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, не влияя при этом на полезную микрофлору кишечника; благодаря ферментной активности улучшается пищеварение; усиливается иммунная защита организма [14].

Пробиотики широко применяются для профилактики и лечения различных инфекционно-воспалительных заболеваний у человека и животных. Среди многочисленных видов пробиотических микроорганизмов, используемых при получении био-препаратов, ведущая роль принадлежит виду *L. acidophilus*.

Цель исследования – отбор перспективного продуцента для пробиотического препарата ветеринарного использования путем изучения биологических свойств новых гомопробиотических изолятов, выделенных из кишечного содержимого здоровых поросят-отъемышей, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в условиях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВПО «Орловский ГАУ» и ФКП «Орловская биофабрика» в период с 2015 по 2020 гг.

Объектом исследования служили 12 изолятов *Lactobacillus spp.*, выделенных из кишечного содержимого 23 здоровых поросят-отъемышей, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

В качестве положительного контроля в отборе перспективного продуцента использовали гомопробиотический штамм *L. acidophilus* ЛГ-1-ДЕП-ВГНКИ, выделенный из пробиотического препарата «Лактобифадол форте» (ООО БФ «Компонент»), пробиотика, широко используемого в современном животноводстве для повышения иммунитета у сельскохозяйственных и домашних животных, нормализации обмена веществ, лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний, стимуляции роста и развития, обладающего высокой кислотообразующей способностью, биологической и антагонистической активностью, то есть способностью подавлять рост бактерий и грибов. Отличительной особенностью данного препарата является возможность его использования в лечебной дозе одновременно с антибиотиками и в течение 10 дней после их отмены.

Лактобактерии выращивали в глубинной культуре на кукурузно-лактозной среде в лабораторной ферментере при следующих режимах культивирования: количество посевного инокулята – 7–9% от объема питательной среды; температура – 30–32 °С, время – 19–23 ч; перемешивание в течение первых двух часов (по 20 мин/ч, $n = 180$ об/мин); начальное значение pH – 7,0–7,2, при культивировании поддерживали pH на уровне 6,5–7,0 (6%-ной аммиачной водой); накопление лактобактерий – не менее $1,5 \cdot 10^9$ КОЕ/см³. Для исследования использовали культуральные жидкости лактобактерий без предварительного отделения бактериальных клеток.

Исследуемые лактобактерии были проверены на соответствие их физиолого-биохимических свойств общепринятым требованиям, предъявляемым к пробиотическим микроорганизмам [15].

Протеолитическую активность определяли в клеточных экстрактах 24–48-часовых культур, полученных при разрушении клеток ультразвуком. Оценку адгезивных свойств осуществляли фотоколориметрическим экспресс-методом [16]. Субстрат для адгезии лактобактерий – эритроциты человека 0(I)Rh⁺ группы крови и эритроциты свиньи. Исследование уровня кислотообразования проводили по методике Тернера [15].

Оценку антагонистических свойств штаммов лактобацилл осуществляли диффузным методом *in vitro*. Тест-объектами в исследовании являлись клинические штаммы *Enterobacteriaceae*, выделенных из кишечного содержимого поросят-отъемышей с клиническими признаками гастроэнтерита, *Escherichia coli* (типичная), *E. coli* (лактозонегативная), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas ruginosa*, *Staphylococcus aureus*. В качестве тест-штамма использовали *E. coli* С 600. Степень антагонистической активности оценивали по величине зоны ингибирования роста тест-штамма (в миллиметрах) вокруг агарового блока.

Для получения информации о природной устойчивости штаммов лактобактерий к антибактериальным препаратам определяли спектр их лекарственной устойчивости методом серийных разведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Полученные данные анализировали согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания». Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Enterobacteriaceae*: пограничные значения МПК (миллиграмм на литр) антибактериальных препаратов, частоты встречаемости резистентных изолятов, изолятов с промежуточной чувствительностью и чувствительных: β-лактамы – ампициллин (≥ 32 , 16, ≤ 8), цефотаксим (≥ 64 , 16-32, ≤ 8), цефиксим (≥ 4 , 2, ≤ 1), меропенем (≥ 16 , 8, ≤ 4); аминогликозиды – канамицин (≥ 64 , 32, ≤ 16).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ MS Excel 2010. Все опыты выполняли в пятикратной повторности. Результаты исследований представлены в виде средних арифметических значений с доверительным интервалом при уровне вероятности $p=0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в ветеринарной медицине используют пробиотические препараты на основе чужеродных спорообразующих микроорганизмов – бактерий рода *Bacillus*, которые характеризуются многими ценными свойствами. Но они быстро элиминируются из желудочно-кишечного тракта животного, так как являются чужеродными для их кишечной микрофлоры. Перспективным способом решения проблем лечения и профилактики заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, в частности для сельскохозяйственных и домашних животных, является применение препаратов на основе гомопробиотических штаммов лактобацилл [17].

В результате метаболизма микроорганизмов-пробиотиков, обладающих протеолитическими свойствами, в кишечнике в основном обеспечивается протеолиз эндотоксинов, аллергенов и др. [18]. Исследование уровня протеолитической активности выделенных изолятов лактобактерий проводили с использованием трех белковых субстратов – гемоглобина, альбумина и казеина (табл. 1).

В целом для всех выделенных изолятов протеолитическая активность в слабокислой среде по гемоглобину в конце стационарной фазы роста продуцента отличалась низкими значениями по сравнению с ее показателями в нейтральной зоне рН-действия по казеину. Наиболее эффективно гидролизуют протеазы изолятов под номерами 3, 7, 10 и контрольный гомопробиотический штамм.

Исследование интенсивности продукции гликолитических ферментов показало, что показатели высокой активности амилазы, целлюлазы, инвертазы находились в пределах 0,2–0,3 ед/мл, галактозидазы, полигалактуроназы и декстраназы – в пределах 0,1–0,2 ед/млу изолятов под номерами 3, 7, 10 и контрольного штамма (табл. 2).

Для всесторонней оценки пробиотических свойств были уточнены физиолого-биохимические характеристики выделенных изолятов, такие как адгезивная активность, кислотообразующая, антагонистическая активности, антибиотикорезистентность.

Одним из основных биологических свойств пробиотических микроорганизмов является адгезивная активность, обеспечивающая способность микроорганизмов-пробиотиков длительно персистировать в составе микробиоты кишечника. Результаты оценки адгезивной активности исследуемых изолятов представлены на рис. 1.

Таблица 1. Протеолитическая активность (усл.ед/мл) выделенных изолятов лактобактерий

Номер изолята	Субстрат		
	Гемоглобин (рН 2,5)	Альбумин (рН 7,0)	Казеин (рН 9,0)
1	81,6±0,11	159,8±0,32	264,5±0,36
2	80,5±0,15	158,6±0,25	262,3±0,15
3	102,4±0,21	280,4±0,36	364±0,07
4	89,6±0,30	168,3±0,28	274,9±0,58
5	88,6±0,28	165,2±0,19	271,6±0,56
6	85,4±0,91	159,3±0,09	269,9±0,48
7	107,3±0,35	187±0,54	281±0,87
8	85,1±0,15	152,3±0,18	268,5±0,68
9	85,9±0,51	152,9±0,87	254,1±0,14
10	100,1±0,84	208±0,46	307±0,85
11	89,6±0,14	171,4±0,84	280,1±0,48
12	87,1±0,58	161,5±0,25	260,8±0,48
Контрольный штамм	104,6±0,36	176,4±0,87	282,1±0,91

Таблица 2. Гликолитическая активность (ед/мл) исследуемых изолятов лактобактерий

Номер изолята	Субстрат					
	Целлобиаза	Инвертаза	Галактозидаза	Амилаза	Полигалактуроназа	Декстраназа
1	0,11	0,18	0,02	0,15	0,08	0,8
2	0,14	0,14	0,02	0,14	0,07	0,8
3	0,21	0,28	0,05	0,21	0,13	0,13
4	0,10	0,16	0,03	0,19	0,08	0,6
5	0,11	0,17	0,02	0,17	0,08	0,8
6	0,15	0,17	0,02	0,16	0,07	0,4
7	0,19	0,21	0,05	0,26	0,14	0,18
8	0,12	0,16	0,03	0,13	0,08	0,6
9	0,12	0,09	0,03	0,13	0,06	0,4
10	0,23	0,25	0,06	0,21	0,09	0,11
11	0,14	0,16	0,03	0,14	0,08	0,6
12	0,11	0,18	0,03	0,11	0,06	0,7
Контрольный штамм	0,19	0,21	0,05	0,16	0,09	0,10

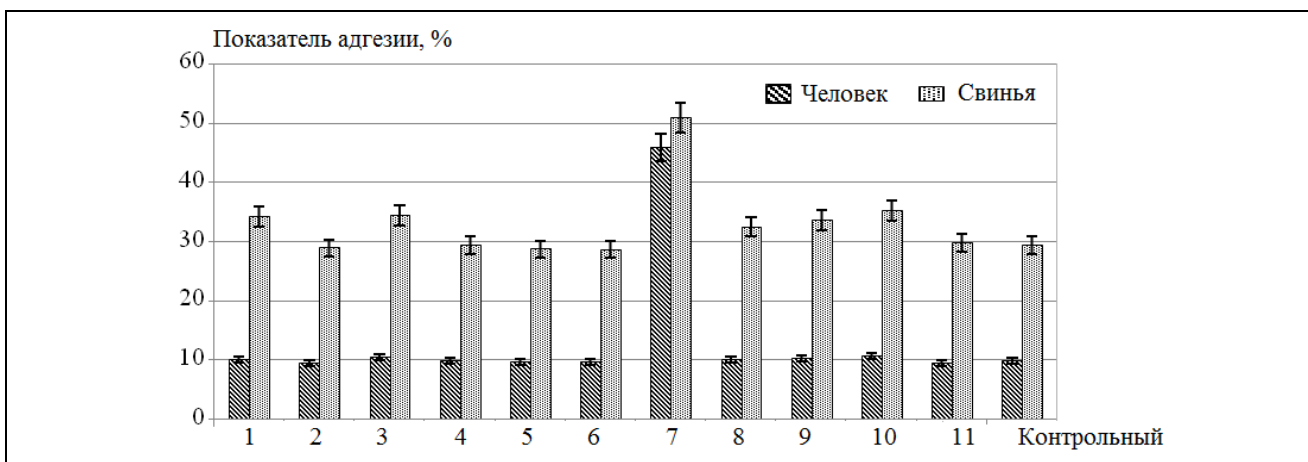


Рис. 1. Адгезивные свойства исследуемых изолятов лактобактерий в отношении эритроцитов человека и эритроцитов свиньи (n=5)

Контрольный штамм лактобактерий проявляет средний уровень адгезии к эритроцитам человека и высокий – к эритроцитам крови свиньи.

Исследуемый изолят под номером 7 обладает высоким уровнем адгезивной активности и в отношении эритроцитов человека, и в отношении эритроцитов свиньи, что открывает перспективы использования данного продуцента для создания биопродукции пробиотического направления как в медицинской, так и в ветеринарной практике. Остальные изоляты лактобактерий проявляют низкую адгезивную активность в отношении эритроцитов человека и средний уровень адгезии – к эритроцитам свиньи.

Важная характеристика, определяющая пробиотический потенциал лактобактерий – способность подавлять рост и размножение энтеробактерий. Лактобактерии в процессе своей жизнедеятельности образуют различные органические кислоты и ряд короткоцепочных жирных кислот и другие кислоты, необходимые для проявления выраженной антагонистической активности в отношении условно-патогенной микрофлоры.

Лактобациллы исследуемых изолятов были способны ингибировать рост и размножение разных видов энтеробактерий, относящихся к возбудителям диарейных заболеваний у поросят. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Таблица. 3. Антагонистическая активность исследуемых штаммов лактобацилл ($\bar{x} \pm I_{95}$, $n=5$)

Номер изолята	Тест-объект					
	<i>E. coli</i> C 600	<i>E. coli</i> типичная	<i>E. coli</i> лактозонегативная	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	Диаметр зоны подавления роста, мм ($n=5$)					
1	37,0	37,0	35,2	32,5	33,1	32,0
2	37,1	37,0	35,1	33,6	33,5	29,7
3	38,6	37,8	36,3	45,4	46,4	39,7
4	38,1	36,2	35,8	39,4	38,2	31,0
5	36,9	36,0	35,7	38,4	37,1	32,5
6	38,0	36,2	34,0	38,1	36,9	33,7
7	47,3	42,3	41,5	48,4	48,0	43,7
8	37,0	36,4	28,0	36,2	36,8	36,1
9	33,1	34,0	31,5	35,8	35,9	36,8
10	39,8	37,2	34,8	46,2	46,0	31,6
11	36,8	35,1	29,1	31,2	33,4	33,0
12	35,1	29,1	30,5	30,6	35,1	35,1
Контрольный штамм	38,3	37,8	35,9	44,1	46,0	39,4

Таблица. 4. Уровень антибиотикорезистентности изолятов лактобактерий

Номер изолята	МПК (мг/л) антибиотиков				
	β-Лактамы				Аминогликозиды
	Ap	Cef	Cefx	Mer	Km
3	16	16	2	8	32
7	8	4	1	4	8
10	8	8	1	4	16
Контрольный штамм	8	8	1	4	16

П р и м е ч а н и е : Ap – ампициллин, Cef – цефотаксим, Cefx – цефиксим, Mer – меропинем, Km – канамицин.



Рис. 2. Кислотообразующая активность изолятов лактобактерий ($\bar{x} \pm I_{95}$, $n=5$)

Анализируя данные табл. 4, можно сделать заключение о том, что наиболее выраженными антагонистическими свойствами из числа изучаемых изолятов обладает изолят под номером 7, который в среднем превышает уровень антагонистической активности контрольного пробиотического штамма (по диаметру зоны задержки роста тест-штамма вокруг агарового блока) на 10–23%.

Антагонистические свойства лактобактерий обусловлены кислотообразующей активностью. Характеристики кислотообразующих свойств изучаемых изолятов лактобактерий приведены на рис. 2.

Из представленных в диаграмме данных следует, что наибольшим уровнем предельного кислотообразования обладают лактобактерии контрольного штамма и исследуемого изолята под номером 7, показатель предельного кислотообразования у которого составил 339,8 градусов Тернера, что больше показателя контрольного штамма на 34,4 градуса Тернера.

Активный рост в жидкой питательной среде при концентрации желчи 20, 30, 40% проявляли все исследуемые изоляты лактобактерий, вследствие чего их можно считать высокоустойчивыми к желчи.

Все исследуемые изоляты хорошо росли в питательной среде, содержащей 2%-ный и 4%-ный растворы поваренной соли. В присутствии 6%-ного раствора поваренной соли наблюдался хороший рост изолята под номером 7 по всей длине столбика культуральной жидкости. Все исследуемые изоляты активно росли в питательных средах со значениями рН 8,3–9,2.

Результаты чувствительности к антибиотикам исследуемых изолятов под номерами 3, 7, 10, перспективных по ряду пробиотических свойств, представлены в табл. 4.

Изолят под номером 3 характеризуется промежуточной чувствительностью к ампициллину,

цефотаксиму, цефиксиму, меропинему, канамицину. Остальные изоляты чувствительны к выбранному антибактериальным препаратам.

Таким образом, по совокупности результатов, полученных в исследовании основных биологических свойств пробиотических микроорганизмов, был определен перспективный гомопробиотический изолят, выделенный из кишечного содержимого здоровых поросят-отъемышей, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта, для создания пробиотического препарата ветеринарного использования. Видовая принадлежность изолята – *L. paracasei*.

Методом прямого совместного культивирования на плотной питательной среде MRS была определена биосовместимость гомопробиотического изолята *L. paracasei* и пробиотического штамма *L. acidophilus* ЛГ-1-ДЕП-ВГНКИ. Продуценты полностью совместимы, обнаружено «слияние пятен» в зоне совместного их культивирования. Физиолого-биохимические характеристики микробного консорциума (при совместном культивировании на кукурузно-лактозной среде) следующие: титр клеток $2,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, устойчив к действию желчи, обладает высокой кислотообразующей способностью (354,8 градуса Тернера), антагонистической активностью (диаметр зоны подавления роста *E. coli* С600 48,4 мм, *S. aureus* – 45,7 мм).

ВЫВОДЫ

Лактобактерии представляют интерес как объект изучения для разработки не только пробиотических препаратов, но продуктов функционального питания, способов коррекции микробиологических нарушений, так как активно участвуют в обменных и регуляторных процессах макроорганизма. Современные заболевания имеют многофакторность развития, в связи с этим становится оче-

видным, что в качестве препаратов выбора для предотвращения или снижения риска развития многофакторных заболеваний должны предлагаться рационально комбинированные пробиотики, имеющие широкий спектр физиологических эффектов и обладающие штаммоспецифическими свойствами.

Согласно проведенным исследованиям, для включения в состав пробиотической биопродукции ветеринарного назначения в качестве микробиологической основы можно рекомендовать гомопrobiотический изолят *L. paracasei* и микробный консорциум данного изолята спробиотическим штаммом *L. acidophilus* ЛГ-1-ДЕП-ВГНКИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Воробьева М.А. Механизм действия пробиотических препаратов. БИО препараты. 2003; 5(3):2–5.
2. Гришель А.И., Кишкурно Е.П. Пробиотики и их роль в современной медицине. Вестник фармации. 2009; 43(1): 1–4.
3. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Самоухина А.М. и др. Антагонистическая активность пробиотических штаммов. Успехи современного естествознания. 2009; 2:73.
4. Ермоленко Е.И. Методы определения антагонистической активности пробиотических штаммов. В кн.: Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. 2-е изд. Под ред. Е.И. Ткаченко и А.Н. Суворова. СПб, «ИнформМед», 2009; 34–41.
5. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Адгезивные и гемагглютинирующие свойства лактобацилл. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1982; 9: 75–78.
6. Ардатская, М.Д., Логинов В.А., Минушкин О.Н. Новые возможности диагностики и коррекции микробиологических нарушений кишечника. Гастроэнтерология. Consiliummedicum. 2013; 2: 51–54.
7. Дроздова Е.А., Щербакова Н.В. Резистентность пробиотических штаммов микроорганизмов к антибиотикам. Вестник ветеринарии. 2013; 66(3): 25–27.
8. Захаренко С.М., Суворов А.Н. Антибиотики, пробиотики, пребиотики: друзья или враги? Consilium Medicum. 2009; 8: 21–29.
9. Кочеровец В.И. Антибактериальные антибиотики и бактериальные пробиотики: возможно ли совместить несовместимое. Антибиотики и химиотерапия. 2018; 5:6.
10. Антипов В.А., Мамсирова С.К., Семененко М.Л. Актуальные проблемы фармации в ветеринарии. Труды Кубанского гос. аграрн. университета (серия: Ветеринарные науки). 2009;1 (ч.1): 253–254.
11. Рябинин Г.В. Определение антагонистической активности штаммов *Lactobacillus* spp., изолированных из желудочно-кишечного тракта здоровых людей. Медицинский академический журнал. 2016; 16(4): 91–92.
12. Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Поддубиков А.В. Коррекция дисбиоза – основа регенеративной медицины. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018; 5: 107–113.
13. Радзинский В.Е., Ордянц И.М., Абдурахманова М.Б. Комбинация пробиотика и метабиотика в комплексной терапии дисбиозов. Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. 2018; 3(21).
14. Ардатская М. Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции. Трудный пациент. 2017; 15(6-7): 35–39.
15. МУ 2.3.2.2789-10. Методические указания, по санитарно-эпидемиологической оценке, безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 104 с.
16. Патент № 2360969 РФ. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов / В.Е. Романов, А.Г. Ивонин, А.Л. Бондаренко. 2009. 11 с.
17. Соколенко Г.Г., Лазарев Б.П., Миньченко С.В. Пробиотики в рациональном кормлении животных. ТППП АПК. 2015; 1: 72–78.
18. Токаев Э.С., Блохина Н.П., Некрасов Е.А. Биологически активные вещества, улучшающие функциональное состояние печени. Вопросы питания. 2007; 76(4): 4–9.

Поступила после доработки 5 апреля 2021 г.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF HOMOPROBIOTIC ISOLATES OF LACTOBACTERIA – PROMISING PRODUCERS OF PROBIOTIC PREPARATIONS

© I.A. Gneusheva, I.Yu. Solokhina, 2021

I.A. Gneusheva

Ph.D. (Eng.), Associate Professor of Biotechnology,
Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhin (Orel, Russia)
E-mail: obc1-2010@mail.ru

I.Yu. Solokhina

Ph.D. (Biol.), Associate Professor of Biotechnology,
Oryol State Agrarian University named after N.V. Parakhin (Orel, Russia)
E-mail: solohinairina@yandex.ru

The current direction is the use of probiotics for the prevention and treatment of infectious and inflammatory diseases of animals, which include *Lactobacillus spp* strains.

The aim of the study was to study the biological properties of new homoprobiotic lactobacillus isolates isolated from the intestinal contents of healthy weaned piglets, with the selection of a promising producer for the creation of a probiotic drug. 12 *Lactobacillus spp.* isolates isolated from the intestinal contents of 23 healthy animals were used as research objects. The homoprobiotic strain of *L. acidophilus* LH-1-DEP-VGNKI isolated from the probiotic drug "Lactobifadol forte" (LLC BF "Component") served as a positive control.

Material and methods. Lactobacilli were grown in a deep culture on a corn-lactose medium. The proteolytic activity was determined in cell extracts destroyed by ultrasound. The adhesive properties were studied using the method of photocolourimetry, the level of acid formation according to the Turner method. The antagonistic properties of lactobacillus strains were studied by a diffuse method in vitro, using *Enterobacteriaceae* strains from the intestinal contents of weaned pigs with gastroenteritis, *E.coli* (typical), *E.coli* (lactose-negative), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* as a test object, and *E.coli* C 600 was used as a test strain. Antibiotic resistance was determined by the method of serial dilutions with the determination of the minimum suppressive concentration.

Results. It was found that the most effective proteolytic and glycolytic activity was shown by isolates numbered 3,7,10 and the control strain. A high level of adhesive activity and acid formation was shown by isolate number 7, which has a pronounced antagonistic activity, as evidenced by the size of the diameter of the growth delay zone of the test strain around the agar block by 10–23% relative to the control. The study of antibiotic resistance of the isolate number 7 revealed that the isolate is sensitive to ampicillin, cefotaxim, cefixime, meropenem, kanamycin. The species of the isolate is *L. ragsasei*.

Conclusion. Thus, the homoprobiotic isolate of *L. paracasei* and the combination of this isolate with the probiotic strain of *L.acidophilus* LH-1-DEP-VGNKI can be recommended for inclusion in the composition of probiotic products for veterinary use.

Key words: *Lactobacillus spp.*, probiotic microorganisms, probiotic preparations, microbial consortium, bioproduction.

For citation: Gneusheva I.A., Solokhina I.Yu. Biological properties of homoprobiotic isolates of lactobacteria - promising producers of probiotic preparations. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(7):10–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-02>

REFERENCES

- Bondarenko V.M., Chuprinina R.P., Vorob'eva M.A. Mehanizm dejstvija probioticheskih preparatov. BIO preparaty. 2003; 5(3):2–5.
- Grishel' A.I., Kishkurno E.P. Probiotiki i ih rol' v sovremennoj medicine. Vestnik farmacii. 2009; 43(1): 1–4.
- Chervinec Ju.V., Chervinec V.M., Samouhina A.M. i dr. Antagonisticheskaja aktivnost' probioticheskih shtammov. Uspehi sovremennogo estestvoznaniya. 2009; 2:73.
- Ermolenko E.I. Metody opredelenija antagonisticheskoy aktivnosti probioticheskih shtammov. V kn.: Disbioz kishechnika. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniju. 2-e izd. Pod red. E.I. Tkachenko i A.N. Suvorova. SPb, «InformMed», 2009; 34–41.
- Brilis V.I., Brilene T.A., Lencner H.P., Lencner A.A. Adgezivnye i gemaggljutinirujushhie svojstva laktobacill. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii. 1982; 9: 75–78.
- Ardatskaja, M.D., Loginov V.A., Minushkin O.N. Novye vozmozhnosti diagnostiki i korrekcii mikrojekologicheskikh narushenij kishechnika. Gastrojenterologija. Consiliummedicum. 2013; 2: 51–54.
- Drozdova E.A., Shherbakova N.V. Reziistentnost' probioticheskih shtammov mikroorganizmov k antibiotikam. Vestnik veterinarii. 2013; 66(3): 25–27.
- Zaharenko S.M., Suvorov A.N. Antibiotiki, probiotiki, prebiotiki: druz'ja ili vrugi? Consilium Medicum. 2009; 8: 21–29.
- Kocherovec V.I. Antibakterial'nye antibiotiki i bakterial'nye probiotiki: vozmozhno li sovместit' nesovместimoe. Antibiotiki i himioterapija. 2018; 5:6.
- Antipov V.A., Mamsirova S.K., Semenenko M.L. Aktual'nye problemy farmacii v veterinarii. Trudy Kubanskogo gos. agrarn. universiteta (serija: Veterinarnye nauki). 2009;1 (ch.1): 253–254.
- Rjabinin G.V. Opredelenie antagonisticheskoy aktivnosti shtammov Lactobacillus spp., izolirovannyh iz zheludочно-kishechnogo trakta zdorovyh ljudej. Medicinskij akademicheskij zhurnal. 2016; 16(4): 91–92.
- Mihajlova N.A., Voevodin D.A., Poddubikov A.V. Korrekcija disbioza - osnova regenerativnoj mediciny. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2018; 5: 107–113.
- Radzinskij V.E., Ordijanc I.M., Abdurahmanova M.B. Kombinacija probiotika i metabiotika v kompleksnoj terapii disbiozov. Akusherstvo i ginekologija: Novosti. Mnenija. Obuchenija. 2018; 3(21).
- Ardatskaja M. D., Stoljarova L.G., Arhipova E.V., Filimonova O.Ju. Metabiotiki kak estestvennoe razvitie probioticheskoj koncepcii. Trudnyj pacient. 2017; 15(6-7): 35–39.
- MU 2.3.2.2789-10. Metodicheskie ukazaniya, po sanitarno-jepidemiologicheskoy ocenke, bezopasnosti i funkcional'nogo potentsiala probioticheskih mikroorganizmov, ispol'zuemyh dlja proizvodstva pishhevyyh produktov. Metodicheskie ukazaniya. M.: Federal'nyj centr gigieny i jepidemiologii Rospotrebnadzora, 2011. 104 s.
- Patent № 2360969 RF. Sposob opredelenija bakteriofiksirujushhej aktivnosti jeritrocitov / V.E. Romanov, A.G. Ivonin, A.L. Bondarenko. 2009. 11 s.
- Sokolenko G.G., Lazarev B.P., Min'chenko S.V. Probiotiki v racional'nom kormlenii zhivotnyh. TPPP APK. 2015; 1: 72–78.
- Tokaev Je.S., Blohina N.P., Nekrasov E.A. Biologicheski aktivnye veshhestva, uluchshajushhie funkcional'noe sostojanie pecheni. Voprosy pitaniya. 2007; 76(4): 4–9.