

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034270

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.23

(21) Номер заявки
201600580

(22) Дата подачи заявки
2016.09.12

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12R 1/25 (2006.01)

(54) НОВЫЙ ШТАММ LACTOBACILLUS PLANTARUM AMT12 И КОМПОЗИЦИЯ,
СОДЕРЖАЩАЯ ШТАММ LACTOBACILLUS PLANTARUM AMT12

(31) P.416833
(32) 2016.04.13
(33) PL
(43) 2017.10.31

(56) RU-C1-2567149
BY-C1-15103
RU-C1-2413761
RU-C2-2316586

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАКТОФАРМ СП. З О.О. (PL)

(72) Изобретатель:
Турек Эвэлина, Турек Ярослав Пётр
(PL)

(74) Представитель:
Андрущак Г.Н. (RU)

(57) Новый штамм бактерии *Lactobacillus plantarum* AMT12 PCM В/00107 и композиция для приготовления кремов и мазей, парафармацевтических, фармацевтических, продовольственных препаратов/продуктов и добавок к пищевым продуктам и воде для людей и животных, включающая новый штамм бактерий, носитель и наполнитель, отличающиеся тем, что бактериальный штамм содержит *Lactobacillus plantarum* AMT12, PCM В/00107 в количестве от 10^1 до 10^{13} колониеобразующих единиц КОЕ/мл.г.

B1

034270

034270

B1

Предметом изобретения является новый штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 и композиция, содержащая новый штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12.

Lactobacillus plantarum относят к молочнокислым бактериям, играющим важную роль в промышленности (Parente E., Ciocia F., Ricciardi A., Zotta T., Felis G.E., Torriani S. 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology* 144, 270-279). Эти бактерии повсеместно встречаются в ферментированных продуктах питания, оливках, сырах, вине и силосе (Tanganurat W., Quinquis B., Lee-lawatcharamas V., Bolotin A., 2009. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables, *Journal Basic Microbiology* 49, 377-385). В связи с этим штаммы этого вида, обладающие пробиотическими свойствами, применяются при производстве функциональных продуктов питания, лекарственных средств или живых вакцин для перорального приема (Shah N.P., 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1262-1277).

Механизм действия пробиотических бактерий является многофакторным и специфичным для отдельных штаммов (Tuohy K.M., Probert H.M., Smejkal C.W., Gibson G.R., 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery* 8, 692-700). Одним из самых изученных способов действия пробиотиков по отношению к патогенам является антагонизм, основанный на выделении пробиотиками в среду бактериостатических и/или бактерицидных веществ, описанных в работе Кесаркоди-Уотсон и соавт. (Kesarcode-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J., Gibson L., 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274, 1-14). Считается, что присутствие пробиотиков в кишечнике или на поверхности кожи тормозит рост потенциально болезнетворных бактерий (Verschuere L., Heang H., Criel G., Dafnis S., Sorgeloos P., Verstraete W., 2000. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1139-1146). Это антибактериальное действие вызывают отдельно или совместно действующие вещества, вырабатываемые бактериями, такие как: антибиотики, бактериоцины, лизоцим, протеазы, перекись водорода, аммиак, диацетил, сидерофоры, отдельные органические кислоты (Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64, 655-671). Эффективность антагонизма, основанного на выделении ингибиторов, во многом зависит от условий проведения эксперимента. Беджицка и соавт. (Biedrzycka E., Markiewicz L.H., Bielecka M., Siwicki A.K., 2007. Kształowanie mikroekosystemu przewodu pokarmowego, Sterowanie rozwojem ukladu pokarmowego и nowonarodzonych ssaków, pod red. Zabielskiego R., Wydawnictwo Rolne i Leśne, 5, 126-140) показали, что антагонистическая активность пробиотических штаммов состоит не только в выработке ингибиторов, но также и в предотвращении колонизации путем коагрегации клеток пробиотических бактерий с клетками патогенов и конкуренция за места связывания со слизистой оболочкой хозяина. В этот процесс вовлечены также такие механизмы, как электростатическое взаимодействие, гидрофобное воздействие, липотейхоевые кислоты (Gomez R., Geovanny D., Balcázar J.L., Shen M., 2007. Probiotics as control agents in aquaculture, *Journal of Ocean University of China*, 6, 76-79). Эти свойства дают возможность и помогают бактериям сохранять существенные преимущества в желудочно-кишечном тракте людей и животных. Динамичная и очень сложная реакция микроорганизмов чрезвычайно важна для эпителиальных клеток кишечника и иммунной системы хозяина (Shi H.N., Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defenses, 2004, *Can. J. Gastroenterol*, 18, 493-500). Это позволяет сохранить гомеостаз и инициирует соответствующую реакцию организма на патогенные микроорганизмы.

Желудочно-кишечный тракт человека и сельскохозяйственных животных (домашней птицы, крупного рогатого скота, свиней, лошадей, овец, коз и т.п.) может отличаться анатомически и функционально. Однако установлено определенное сходство микрофлоры кишечника как с точки зрения количества, так и присутствия тех же самых доминирующих групп бактерий. В микрофлоре кишечника животных встречается большое количество комменсальных бактерий, которые являются патогенными для организма животного и являются причиной зоонозов. К наиболее распространенным патогенным бактериям животного происхождения относятся: *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* и др., такие как *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp. и *Clostridium* sp., которые могут передаваться, однако не обязательно передаются через пищу животного происхождения.

В основополагающей работе Probiotics: Intestinal inoculants for production animals содержится обзор доступных пробиотиков, используемых при выращивании различных животных, в том числе цыплят, поросят и телят (Fox Veterinary Medicine, 08/1988).

В патенте WO 89/05849 описаны бактерии *Lactobacillus* желудочно-кишечного тракта свиньи, стойкие к кислоте и желчи, которые по заявлению авторов можно использовать для ферментации молока, которым затем можно кормить поросят, чтобы предотвратить диарею.

В опубликованных патентах US 5705160, EP 353581, PL 179838, PL 195089, PL 214583 описываются свойства многих штаммов *Lactobacillus plantarum*, обладающих свойствами выработки большого количества бактериостатических веществ.

Заражение бактериями *Salmonella* относится к наиболее распространенным заболеваниям людей, передающихся при употреблении в пищу. Зараженные продукты из домашней птицы являются одним из

основных источников заражения. Меры, принимаемые для предотвращения заражения бактериями *Salmonella* от домашней птицы, за редкими исключениями, связаны с требованиями обеспечения здоровья населения и в меньшей степени в стремлении к существенному повышению эффективности производства мяса птицы. В этой связи разумно и желательно использовать натуральные добавки в пищу для птицы, которые бы позволили снизить количество бактерий *Salmonella* в кишечнике.

Было показано, что использование пробиотических препаратов оказывает благотворное воздействие на кожу за счет действия на систему "кишечник-мозг-кожа". Исходя из этого предположения, неправильная диета с низким содержанием клетчатки, стресс, прием антибиотиков приводят к чрезмерному росту в кишечнике потенциально патогенных и/или патогенных микроорганизмов. В результате ослабляется кишечный барьер и в кровь попадают токсичные вещества, вызывающие воспалительный процесс. А у людей, предрасположенных к обыкновенным угрям, розацеа и аллергии, это может привести к обострению кожных изменений. Поэтому разумно использовать пробиотические бактерии с подтвержденными свойствами в кремах или мазях в качестве своего рода "щита", защищающего от патогенных микроорганизмов. Их действие основано на угнетении колонизации патогенных микроорганизмов, присутствующих на коже, путем блокировки их присоединения при одновременной выработке веществ, имеющих антибактериальное действие. Кроме того, пробиотические бактерии ингибируют иммунологический ответ и, как следствие, уменьшают воспаление в коже. Они дополнительно разлагают кожный жир и кожные выделения и тем самым облегчают усвоение питательных веществ, содержащихся в креме.

Целью настоящего изобретения является выделение нового штамма *Lactobacillus plantarum* с пробиотическими свойствами, обладающего, в частности, бактерицидным действием против условно-патогенных и/или патогенных микроорганизмов людей и животных. Штамм будет оказывать оптимальное воздействие на желудочно-кишечный тракт и кожу людей и животных.

Сутью изобретения является новый штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 и композиция, содержащая новый штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 и носитель, отличающиеся исключительными пробиотическими свойствами с особой антагонистической активностью по отношению к бактериям, принадлежащим к видам *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, которые являются патогенными микроорганизмами людей и животных. Она предназначена для приготовления кремов и мазей, парафармацевтических, фармацевтических, продовольственных препаратов/продуктов и добавок к пищевым продуктам и воде для людей и животных. Штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 был депонирован в Польской коллекции микроорганизмов в Институте иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук во Вроцлаве, ячейка № В/00107.

Идентификация штамма.

Штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 происходит из растительной среды. Штамм был депонирован согласно положениям будапештского договора в Польской коллекции микроорганизмов в Институте иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук во Вроцлаве. Депонирование было произведено 03.02.2016 г. и обозначено номером В/00107.

Обозначение видовой принадлежности штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12.

Для исследования видовой принадлежности штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12 было проведено генотипирование методом ПЦР с использованием видоспецифических праймеров.

Генотипирование методом ПЦР.

Идентификация выделенных штаммов была проведена с использованием метода секвенирования ДНК. Предоставленный материал послужил для выделения ДНК.

Выделение ДНК.

Выделение ДНК проводилось по следующей процедуре:

- 1) в пробирку Эппендорфа внесли 1 мл бактериальной культуры, центрифугировали (в течение 1 мин на максимальной скорости) и слили надосадочную жидкость. Эту операцию повторили 3 раза;
- 2) в пробирку с клетками добавили 100 мкл лизисного буфера LT и по 10 мкл протеиназы К и лизоцима;
- 3) пробирку инкубировали при температуре 50°C в течение 60 мин (при этом перемешивали вихревой мешалкой через каждые 15 мин);
- 4) после инкубации пробирку интенсивно перемешивали в вихревой мешалке в течение 20 с;
- 5) образец центрифугировали 3 мин (12 тысяч оборотов, центрифуга Эппендорфа);
- 6) надосадочную жидкость слили в ранее описанную миниколонку для очистки ДНК;
- 7) центрифугировали 1 мин (12 тысяч оборотов, центрифуга Эппендорфа);
- 8) в миниколонку добавили 500 мкл промывочного раствора А1;
- 9) центрифугировали 1 мин (12 тысяч оборотов, центрифуга Эппендорфа);
- 10) перенесли миниколонку в новую пробирку (2 мл) и добавили в миниколонку 300 мкл промывочного раствора А1;
- 11) центрифугировали 3 мин (12 тысяч оборотов, центрифуга Эппендорфа);
- 12) миниколонку перенесли в новую пробирку (1,5 мл) и к осадку на дне миниколонки добавили 60 мкл деионизированной воды;
- 13) инкубировали образец в течение 5 мин при комнатной температуре;

- 14) центрифугировали 1 мин (12 тысяч оборотов, центрифуга Эппендорфа);
 15) миниколонку убрали, а очищенную ДНК, находящуюся в пробирке, хранили в холодильнике;
 16) качественный и количественный анализ ДНК проводили спектрофотометрическим методом.

ПЦР и секвенирование ДНК.

Выделенную ДНК амплифицировали методом ПЦР.

Компоненты смеси для ПЦР:

- 1) 10 × буфер ДНК-полимеразы 6 мкл,
- 2) MgCl₂ 25 ммоль/л, 2,4 мкл,
- 3) свободные нуклеотиды 2 ммоль/л, 1,3 мкл,
- 4) праймер R 20 пмоль, 0,5 мкл,
- 5) праймер F 20 пмоль, 0,5 мкл,
- 6) H₂O 15 мкл,
- 7) ДНК-полимераза 2 ед./1 мкл, 0,15 мкл.

Праймер R: 341: 5'- CCTACGGGAGGCAGCAG -3' (Muyzer et al. 1993)

Праймер F: 16SR: 5'- TACCTTGTTACGACTTCACCCCA-3' (Rossau et al.

1991)

Полученные в результате ПЦР продукты были подвергнуты реакции секвенирования в специализированной лаборатории GENOMED (Варшава, ул. Пончова, 12). Elmer ABI 373 Automated DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США).

В результате секвенирования получена последовательность ДНК фрагмента гена 16S rRNA каждого из проанализированных штаммов.

```
GTCTGATGGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAAC
CTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTA
TTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG
TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGA
AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGG
TCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTC
CGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTC
```

Каждая из полученных последовательностей длиной около 650 п.о. была идентичной. Сравнительный анализ с последовательностями ДНК, депонированными в Банке генов (NCBI), показал, что проанализированная последовательность идентична последовательности *Lactobacillus plantarum*.

Проведенные методом генотипирования исследования подтвердили, что исследуемый штамм AMT12 относится к виду *Lactobacillus plantarum*.

Исследование *in vitro* антагонистического действия штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 против возбудителей болезней желудочно-кишечного тракта и кожи.

В исследованиях использовались штаммы видов *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* (штаммы: *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* KOS 64, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* 65/s/10) и *Escherichia coli* (штаммы *Escherichia coli* O157:H7 веротоксин-продуцирующий штамм, *Escherichia coli* Nissle 1917-штамм, выделенный из коммерческой пищевой добавки под названием Mutaflor), *Staphylococcus aureus* ATTC 33862.

Используемые в исследованиях *in vitro* патогенные штаммы получены из Государственного центра сальмонеллы в Гдыне (*Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* KOS 64), Управления ветеринарной гигиены (*Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* 65/s/10-местный штамм, выделенный из больных птиц) и Института репродукции животных и исследований пищевых продуктов Польской академии наук в г. Ольштыне (*Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Staphylococcus aureus* ATTC 33862).

Штамм *L. plantarum* AMT12 был получен из собственной коллекции микроорганизмов фирмы PROBIOS Sp. z o.o. Патогенные штаммы хранили в лиофилизированной форме при температуре 4°C и непосредственно перед исследованием активировали путем двукратного пропускания через триптический соевый бульон (TSB, Merck, кат. № 1054590500).

Для определения антибактериального действия бактерии *L. plantarum* AMT12 по отношению к из-

бранным патогенным микроорганизмам, относящимся к видам *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, было проведено совместное культивирование в триптическом соевом бульоне (TSB, Merck, № кат. 1054590500), который обеспечивает хороший рост ингибирующего штамма - *Lactobacillus plantarum* AMT12 и ингибируемых бактерий - *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* KOS 64, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* 65/s/10, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Staphylococcus aureus* ATTC 33862.

В совместно выращиваемую культуру (исследуемый образец) инокулировали лиофилизированный штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 на уровне 10^9 колониеобразующих единиц/мл (далее КОЕ/мл) и активную монокультуру патогенного штамма из вида *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* в количестве от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл, *Escherichia coli* в количестве от 10^6 до 10^7 КОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* в количестве 10^6 КОЕ/мл. Контрольными образцами в проводимом эксперименте были одиночные штаммы патогенных бактерий (*Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* KOS 64, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* 65/s/10, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Staphylococcus aureus* ATTC 33862) и монокультура *Lactobacillus plantarum* AMT12 с использованием уровня инокулята и жидкой среды, как в совместных культурах.

Совместные и отдельные культуры готовили в четырех параллельных пробирках в трех сериях. Инкубацию проводили в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 0 (т.н. нулевой образец определения инокулята), 24, 48 и 72 ч. После инкубации определяли количество живых клеток бактерии *Lactobacillus plantarum* и патогенных микроорганизмов в совместных и контрольных культурах чашечным методом с использованием агарового субстрата (табл. 1).

Исследуемый материал разбавили 1% пептонной водой с использованием метода последовательных десятичных разведений и высевали на дно чашки Петри, затем залили жидкой агаровой питательной средой при температуре около 45°C . Сразу после затвердевания питательной среды чашки переворачивали вверх дном и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 или 48 ч в аэробных или же анаэробных условиях. Условия культивирования приведены в табл. 1.

После инкубации подсчитывали колонии бактерий в совместных культурах и сравнивали с количеством бактерий в контрольных культурах (отдельных).

Таблица 1

Условия культивирования исследуемых штаммов бактерий

Условное обозначение	Используемая питательная среда	Условия инкубации
<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT12	Агар MRS (Merck, кат. № 1106600500) согласно de Man'a J.C, Rogosa M., Sharpe E.M (1960)	$37^\circ\text{C}/48$ ч, микроаэрофильные условия, полученные путем применения двухслойной питательной среды Агар MRS (Merck)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Macconkey Agar (Merck, кат. № 1054650500)	$37^\circ\text{C}/24$ ч, аэробные условия
<i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар <i>Enteritidis</i> KOS 64, <i>Salmonella enterica</i> подвид <i>enterica</i> серовар <i>Enteritidis</i> 65/s/10	Chromogenic LAB-AGAR Base (BIOCORP, кат. № PS598) + добавка (BIOCORP, кат. № SL0061)	$37^\circ\text{C}/24$ ч, аэробные условия
<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 33682	Braid-Parkera (BTL, кат. № P-0026)	$37^\circ\text{C}/24$ ч, аэробные условия

Результаты исследований *in vitro* антагонистического действия штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 против возбудителей болезней желудочно-кишечного тракта и кожи представлены в табл. 2.

Исследование in vitro антагонистического действия штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 против возбудителей болезней желудочно-кишечного тракта и кожи

	<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT12	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> Nissle1917	<i>Salmonella</i> Enteritidis KOS64	<i>Salmonella</i> Enteritidis 65/s/10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>E. coli</i> Nissle1917	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. Enteritidis</i> KOS64	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. Enteritidis</i> 65/s/10	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. aureus</i> ATCC33862
Инокулят											
<i>L. plantarum</i> AMT12	6,8x10 ⁸						6,8x10 ⁸	6,8x10 ⁸	6,8x10 ⁸	6,8x10 ⁸	6,8x10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7		9,0x10 ⁸					9,0x10 ⁸				
<i>E. coli</i> Nissle1917			1,4x10 ⁷					1,4x10 ⁷			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				1,3x10 ⁸					1,3x10 ⁸		
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10					1,7x10 ⁸					1,7x10 ⁸	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862						7,3x10 ⁸					7,3x10 ⁸
24 ч инкубации											
<i>L. plantarum</i> AMT12	1,3x10 ⁹						1,5x10 ⁹	1,0x10 ⁹	2,7x10 ⁸	1,0x10 ⁹	9,8x10 ⁸
<i>E. coli</i> O157:H7		7,8x10 ⁸					Nb				
<i>E. coli</i> Nissle1917			7,4x10 ⁸					Nb			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				2,1x10 ⁸					Nb		
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10					4,7x10 ⁸					Nb	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862						1,0x10 ⁹					Nb
	<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT12	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Escherichia coli</i> Nissle1917	<i>Salmonella</i> Enteritidis KOS64	<i>Salmonella</i> Enteritidis 65/s/10	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>E. coli</i> Nissle1917	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. Enteritidis</i> KOS64	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. Enteritidis</i> 65/s/10	<i>L. plantarum</i> AMT12 + <i>S. aureus</i> ATCC33862
48 ч инкубации											
<i>L. plantarum</i> AMT12	1,2x10 ⁸						2,2x10 ⁸	4,2x10 ⁸	1,3x10 ⁸	2,7x10 ⁸	4,0x10 ⁷
<i>E. coli</i> O157:H7		4,4x10 ⁸					Nb				
<i>E. coli</i> Nissle1917			2,4x10 ⁸					Nb			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				2,0x10 ⁸					Nb		
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10					6,9x10 ⁸					Nb	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862						9,8x10 ⁸					Nb
72 ч инкубации											
<i>L. plantarum</i> AMT12	5,2x10 ⁷						2,65x10 ⁸	1,25x10 ⁹	1,25x10 ⁸	1,20x10 ⁸	1,0x10 ⁷
<i>E. coli</i> O157:H7		2,1x10 ⁸					Nb				
<i>E. coli</i> Nissle1917			8,9x10 ⁷					Nb			
<i>S. Enteritidis</i> KOS64				1,6x10 ⁸					Nb		
<i>S. Enteritidis</i> 65/s/10					3,6x10 ⁸					Nb	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33862						2,4x10 ⁸					Nb

* Nb - отсутствует в 1 мл культуры

В проведенных исследованиях *in vitro* установлено полное уничтожение бактерий *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* KOS64, *Salmonella enterica* подвид *enterica* серовар *Enteritidis* 65/s/10, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* Nissle 1917 и *Staphylococcus aureus* ATTC 33862 после 24-часовой инкубации с бактерией *Lactobacillus plantarum* AMT12.

Определение способности к размножению бактерии *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии микотоксинов деоксиниваленона и зеараленона.

В жидкую питательную среду MRS (Merck, кат. № 1106610500) инокулировали штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 в дозе $2,8 \times 10^6$ колониеобразующих единиц/мл и микотоксин деоксиниваленон (Sigma-Aldrich, кат. № 32943-5MG) или зеараленон (Sigma-Aldrich, кат. № 32939-5MG) с конечной концентрацией в образце 2 мкг/мл каждый. Культивирование выполняли в трех параллельных пробирках в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 24 и 48 ч. Дополнительно параллельно выполняли контрольное культивирование исследуемого штамма без добавления исследуемых микотоксинов в аэробных условиях и при оптимальной температуре роста, т.е. 37°C. Количество живых клеток определяли непосредственно после инокуляции и через 24 и 48 ч. Инкубацию бактерий на чашках Петри проводили при температуре 37°C в течение 48 ч в анаэробных условиях.

Данные представлены в табл. 3

Таблица 3

Определение способности к размножению бактерии *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии микотоксинов деоксиниваленона и зеараленона

Исследуемые образцы	Инокулят [КОЕ/мл]	Количество через 24 часа инкубации [КОЕ/мл]	Количество через 48 часов инкубации [КОЕ/мл]
<i>L. plantarum</i> AMT12 (контроль)	$2,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^9$	$6,2 \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> AMT12 +	$2,8 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$	$3,5 \times 10^8$
деоксиниваленон			
<i>L. plantarum</i> AMT12 + зеараленон	$2,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^8$

Штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 продемонстрировал способность к росту в присутствии исследуемых микотоксинов, т.е. деоксиниваленона и зеараленона, по сравнению с параллельным культивированием штамма AMT12 (табл. 3).

В первые сутки инкубации количество *L. plantarum* AMT12 находилось на уровне 10^9 колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл). Через 48 ч инкубации во всех исследуемых образцах было установлено снижение числа бактерий штамма AMT12 до уровня 10^8 КОЕ/мл.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 обладает уникальными свойствами роста и размножения в присутствии одних из самых опасных микотоксинов - деоксиниваленона или зеараленона.

Определение способности к росту штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии избранных антибиотиков, чаще всего используемых для лечения животных.

Исследование способности роста штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии избранных 20 антибиотиков, было проведено при помощи метода совместного культивирования. Для этого в питательную среду MRS (Merck, кат. № 1106610500) инокулировали штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 в дозе $2,1 \times 10^6$ колониеобразующих единиц/мл и один из 20 антибиотиков в концентрации, соответствующей дозе антибиотика, используемой для животных, в пересчете на килограмм массы тела (табл. 4).

Культивирование выполняли в трех параллельных пробирках в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 24 ч. Дополнительно параллельно выполняли контрольное культивирование исследуемого штамма без добавления исследуемых антибиотиков. Количество живых клеток определяли непосредственно после инокуляции и через 24 ч.

Данные, касающиеся способности к росту штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии избранных антибиотиков, используемых для лечения животных, собраны в табл. 4.

Определение способности к росту штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии избранных антибиотиков, чаще всего используемых для лечения животных

№ з/п	Исследуемый образец	Инокулят [КОЕ/мл]	Число бактерий <i>L. plantarum</i> AMT12 через 24 часа после инокуляции [КОЕ/мл]
0	Контрольная культура AMT12 без добавления антибиотика	$2,1 \times 10^6$	3×10^9
1	AMT12 + Тиамулин 20,2 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$
2	AMT12 + Энрофлоксацин 10 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^9$
3	AMT12 + Триметоприм/сульфетоксазол 100 мг+50 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
4	AMT12 + Колистин 0,37 мл/10кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^9$
5	AMT12 + Флорфеникол 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
6	AMT12 + Тилмикозин 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^9$
7	AMT12 + Толтразурил 7 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$
8	AMT12 + Ампролиум 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^9$
9	AMT12 + Левамизол 25 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$
10	AMT12 + Флумендазол 1,43 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$2,2 \times 10^9$
11	AMT12 + Доксциклин 50mg/1 кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$
12	AMT12 + Амоксицилин 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
13	AMT12 + Неомицин 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^9$
14	AMT12 + Сульфалорпиразин натрий 50 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$
15	AMT12 + Амоксицилин + клавулановая кислота 8 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	Отсутствует
16	AMT12 + Феноксиметилпенициллин 20 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
17	AMT12 + Линкомицин 5 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
18	AMT12 + Линкомицин + спектиномицин 150 единиц антибиотической активности /кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$
19	AMT12 + Тилвалозин 40 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$
20	AMT12 + Тилозин 100 мг/кг м.т.	$2,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$

Штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 продемонстрировал уникально широкий спектр стойкости к

исследуемым антибиотикам. В присутствии 11 антибиотиков (тиамулин гидроген fumarат, энрофлоксацин, колистин, тилмикозин, толтразурил, ампролиум, левамизола гидрохлорид, флумендазол, неомицин, сульфаклорпиразин натрий, линкомицин) из 20 исследованных антибиотиков была продемонстрирована прекрасная способность к размножению штамма АМТ12 по сравнению с числом, которое штамм достигал в контрольной культуре. В то же время в присутствии флорфеникола, доксицилина, феноксиметилпеницилина и тилозина число *L. plantarum* АМТ12 оставалось на уровне инокулята. В случае культур с сульфметоксазолом, амоксицилином, линкомицином совместно с спектриномицином, тилвалозином отмечено падение числа бактерий штамма АМТ12 на 1-3 порядка по сравнению с контрольным образцом. *Lactobacillus plantarum* АМТ12 не продемонстрировал антибиотической стойкости только по отношению к одному двухкомпонентному препарату. А именно амоксицилину с добавлением клавулановой кислоты.

Определение способности к размножению штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12 при температуре 15 и 20°C

В питательную среду MRS (Merck, кат. № 1106610500) инокулировали штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 в дозе ок. 10^7 колониеобразующих единиц/мл. Культивирование выполняли в трех параллельных пробирках в аэробных условиях при температуре 15 и 20°C в течение 24, 48 и 72 ч. Дополнительно параллельно выполняли контрольное культивирование исследуемого штамма при оптимальной температуре роста, т.е. 37°C. Количество живых клеток определяли непосредственно после инокуляции и через 24, 28 и 72 ч.

Таблица 5

Определение возможности роста штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12 при температурах 15 и 20°C

	Число бактерий <i>Lactobacillus plantarum</i> АМТ12 (КОЕ/мл)			
	Инокулят	24 ч инкубации	48 ч инкубации	72 ч инкубации
<i>Lactobacillus plantarum</i> АМТ12 (контрольная культура, инкубация при температуре 37 °С)	$1,8 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$	$6,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
<i>Lactobacillus plantarum</i> АМТ12 (инкубация при температуре 15 °С)	$1,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
<i>Lactobacillus plantarum</i> АМТ12 (инкубация при температуре 20 °С)	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$	$2,9 \times 10^9$

Lactobacillus plantarum АМТ12 продемонстрировал способность к росту при температурах 15 и 20°C. Исследуемый штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 немного медленней размножался в первые сутки инкубации, проводимой при температуре 15°C, когда он достиг числа $1,4 \times 10^8$ колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл) по сравнению с проводимым параллельно контрольным культивированием - $1,5 \times 10^9$ КОЕ/мл. Через 48 и 72 ч инкубации число бактерий составило соответственно $1,6 \times 10^9$ и $2,3 \times 10^9$ КОЕ/мл. В то же время в контрольной культуре в последующих днях инкубации было отмечено снижение числа бактерий до уровня $\sim 10^8$ КОЕ/мл. При этом число популяции *L. plantarum* АМТ12 при температуре 20°C было сравнимо с числом клеток, которого штамм АМТ12 достигал при оптимальной температуре роста, т.е. 37°C.

Через 24 и 48 ч инкубации при 20°C число бактерий составляло соответственно $2,0 \times 10^9$, $2,9 \times 10^9$ КОЕ/мл и в последующие сутки инкубации осталось неизменным.

Таким образом, установлено, что штамм *Lactobacillus plantarum* АМТ12 обладает уникальными свойствами роста при низких температурах, т.е. ниже 16°C.

Определение выживаемости штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12 при низком значении pH и в присутствии солей желчных кислот.

Выживаемость штамма *Lactobacillus plantarum* АМТ12 при низком pH определялась путем сниже-

ния кислотности культуры *Lactobacillus plantarum* AMT12, находящейся в стационарной фазе роста, до величины pH 3. В то же время в случае определения выживаемости штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии солей желчных кислот сначала повышали величину pH культуры *Lactobacillus plantarum* AMT12 до 6, а потом добавляли соли желчных кислот в количестве, составляющем 3% культуры. Выживаемость штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 при низком pH определяли перед снижением pH культуры (контрольный образец), сразу же после снижения pH культуры до 3, т.е. через 0 мин, а потом через 40 и 180 мин инкубации при температуре 37°C в анаэробных условиях. Выживаемость *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии солей желчных кислот определяли перед добавлением солей желчных кислот (контрольный образец), сразу же после их добавления, т.е. через 0 мин, и через 1, 3 и 6 ч инкубации при температуре 37°C в анаэробных условиях. Живые клетки бактерии *Lactobacillus plantarum* AMT12 определяли в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл) с использованием чашечного метода. Выживаемость штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12, выраженная в процентах по отношению к числу клеток *Lactobacillus plantarum* AMT12, через 180 мин в случае определения выживаемости при pH 3 и через 6 ч в случае определения числа *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии солей желчных кислот по сравнению с соответствующим числом бактерий штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в контрольном образце.

Таблица 6

Выживаемость штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 при pH 3

	Число бактерий (log ₁₀ КОЕ/мл)				Выживаемость через 180 минут
	Перед снижением pH	pH=3			
	0	0	40 минут	180 минут	%
<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT12	8,95	9,08	9,07	8,98	100

Таблица 7

Выживаемость штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 в присутствии 3% солей желчных кислот

	Число бактерий (log ₁₀ КОЕ/мл)					Выживаемость через 6 ч %
	перед добавлени ем солей желчных кислот	после добавления солей желчных кислот				
		0 ч	1 ч	3 ч	6 ч	
<i>Lactobacillus plantarum</i> AMT12	9,03	8,92	8,70	8,03	8,05	89

Исследуемый штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 продемонстрировал 100% выживаемость при низком pH 3 и 89% выживаемость в присутствии солей желчных кислот.

Результаты показали высокую стойкость штамма *Lactobacillus plantarum* AMT12 при низком pH и к солям желчных кислот, что свидетельствует о приспособлении этого штамма к условиям, преобладающим в желудочно-кишечном тракте.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами исполнения.

Пример 1.

Пробиотическая композиция в качестве добавки к пище или воде для птицы представляет собой продукт в форме лиофилизированных бактерий и связующего вещества, а в качестве бактериального штамма содержит штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 РСМ В/00107 в количестве $2,5 \times 10^6$ колониеобразующих единиц КОЕ/мл.

Пример 2.

Пробиотическая композиция в качестве добавки к пище или воде для аквакультуры представляет собой продукт в форме лиофилизированных бактерий и связующего вещества, а также содержит бактериальный штамм *Lactobacillus plantarum* AMT12 РСМ В/00107 в количестве $2,0 \times 10^7$ колониеобразующих единиц КОЕ/мл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бактерии с пробиотической активностью *Lactobacillus plantarum* АМТ12 РСМ В/00107.
2. Пробиотическая композиция, содержащая штамм бактерий по п.1 в количестве от 10^3 до 10^{13} колониобразующих единиц КОЕ/мл.
3. Пробиотическая композиция по п.2, предназначенная для приготовления кремов, мазей, парафармацевтических и фармацевтических препаратов, ферментных пищевых продуктов и добавок к пищевым продуктам и питьевой воде.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
