

На правах рукописи

КАШПЕРОВА ТАМАРА АРТУРОВНА

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ШТАММОВ
BACILLUS SUBTILIS И *BACILLUS LICHENIFORMIS***

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология
03.00.23 - биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Кольцово - 2005

Работа выполнена в научно-исследовательском конструкторско-технологическом институте биологически активных веществ
ФГУП государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Научный руководитель: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Белявская Валентина Александровна

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор
Мальгин Эрнст Георгиевич

кандидат ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Юшков Юрий Георгиевич

Ведущая организация: ФГОУ ВПО Новосибирский
государственный аграрный
университет

Защита состоится «31» мая 2005 г. в 12 ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 при ГНУ Институт экспериментальной, ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, СО РАСХН, ИЭВСидВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «26» апреля 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Широкое распространение резистентных форм микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков нередко приводит к развитию дисбактериозов, частота которых растет /Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1997, 2000; Митрохин С.Д., 2004/. В промышленном птицеводстве желудочно-кишечные заболевания занимают второе место после вирусных и являются основной причиной гибели молодняка птицы /Панин А.Н., 2001/. Известно, что Европейский Союз запретил использование ряда антибиотиков в качестве стимуляторов роста и ограничил их применение с лечебно-профилактической целью для птицеводства /Башкиров О.Г., 2001/. В последние годы появились новые подходы к лечению дисбактериозов, связанные с восстановлением естественной экологии организма и основанные на использовании активных биологических продуктов. Одним из аспектов такого подхода является нормализация измененного микробного пейзажа организма при помощи бактериальных препаратов /Мирошник О.А., 1997; Бондаренко В.М. и др., 1998; Ouwervhand et al., 2002; Янковский Д.С. и др., 2004/.

Пробиотики составляют большой класс биопрепаратов, используемых для коррекции дисбактериоза и лечения диарейных заболеваний. В отличие от антибиотиков, они не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, безвредны, экологически чисты и не имеют противопоказаний для применения. Некоторые полезные свойства пробиотических штаммов бацилл делают их важным арсеналом совершенствования биопрепаратов. Прежде всего, это высокая ферментативная активность, позволяющая им регулировать и стимулировать пищеварение, способность оказывать противоаллергенное, антиоксидантное действие и повышать неспецифическую резистентность макроорганизма /Сорокулова И.Б., 1997; Малик Н.И., Панин А.Н., 2001; Isolauri E. et al., 2002/. Антагонизм в отношении широкого круга патогенных и условнопатогенных микроорганизмов, самостоятельная элиминация из желудочно-кишечного тракта, делает конструирование лечебно-

профилактических препаратов из пробиотических бацилл особенно перспективным. Среди существующих в настоящее время пробиотиков нет высокоэффективных средств, характеризующихся выраженной противовирусной активностью. В то же время известно, что заболевания вирусной и вирусно-бактериальной этиологии составляют значительную часть инфекционной патологии человека и животных. Вирусные инфекции, как правило, осложняются бактериальными и наоборот. Поэтому представляется весьма актуальной проблема разработки средств, характеризующихся одновременно антибактериальными и противовирусными свойствами. Для ее решения пробиотики используют в сочетании с различными иммуностимуляторами, противовирусными веществами и цитокинами, среди которых наиболее широко представлены препараты интерферона. Однако этот подход усложняет технологию производства и повышает цену, что часто делает такие комплексные препараты нерентабельными, поэтому в реальной практике они имеют ограниченное применение.

Альтернативой такому подходу является одно из перспективных направлений разработки новых биопрепаратов - непосредственная модификация пробиотических штаммов путем клонирования генов противовирусных белков. Это направление в течение ряда лет широко разрабатывается в ГНЦ ВБ «Вектор», где были созданы штаммы микроорганизмов, продуцирующие цитокины, в частности *B.subtilis* 2335/pBMB 105, продуцирующий альфа 2 -интерферон /Белявская В.А., 2002/. Созданный на его основе пробиотик Субалин, наряду с высокой антибактериальной активностью обладает противовирусными свойствами /Чудновская Н.В. и др., 1995; Белявская В.А. и др., 2002/. Следует отметить, что штамм *B.subtilis*, составляющий основу препарата субалин, является строгим аэробом. А как известно, внутренние полости организма значительно различаются по уровню аэрации и имеют протяженные анаэробные участки. Эту проблему можно решить путем составления микробного консорциума из штаммов, дополняющих свойства друг друга. Поэтому разработка препаратов на основе генетически модифицированных микроорганизмов, способных осуществлять доставку в организм терапевтических

белков при оральном введении является весьма перспективной и актуальной задачей.

Цель и задачи исследования Целью настоящей работы явилось конструирование генетически модифицированного штамма *Bacillus licheniformis*, продуцирующего альфа 2 - интерферон для потенциальной его доставки в организм при оральном введении и создание консорциума из рекомбинантных штаммов *Bacillus* для нового пробиотического препарата. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Сконструировать генетически модифицированный штамм *Bacillus licheniformis*, продуцирующий ИФН-α2 и изучить возможность его использования в качестве вектора доставки целевого белка в организм.
- Сконструировать на его основе микробный консорциум, включив дополнительно ранее созданный штамм *B. subtilis* для разработки пробиотического препарата с улучшенными свойствами.
- Разработать технологию изготовления препарата и получить опытные партии для проведения испытаний.
- Провести испытания эффективности опытных партий препарата в птицеводстве.

Научная новизна Впервые сконструирован и подробно исследован генетически модифицированный штамм *Bacillus licheniformis* 2336/pBMB105, кодирующий ген интерферона человека типа альфа 2. Исследован консорциум рекомбинантных штаммов *Bacillus* и показана перспективность его использования для разработки нового пробиотического препарата с улучшенными свойствами. Разработан пробиотик субалин-форте и исследована его эффективность для повышения хозяйственно-экономических показателей при выращивании цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк».

По результатам проведенных исследований получены патенты РФ: «Штамм бактерий *Bacillus licheniformis*, обладающий антивирусной и антибактериальной активностью» (№2172343, 1998) и «Пробиотический препарат комплексного действия» (№2159625, 1999).

Практическая значимость Предложен новый пробиотик субалин-форте для повышения хозяйственно-экономических показателей птицеводства. Сконструирован генетически модифицированный штамм *Bacillus licheniformis* 2336/pBMB105, продуцирующий интерферон, который может быть использован для разработки новых пробиотических препаратов. На основе материалов диссертации разработаны технические условия получения препарата субалин-форте.

Основные положения, выносимые на защиту

- рекомбинантный штамм *Bacillus licheniformis* 2336/pBMB 105, способный к стабильному поддержанию плазмиды, обеспечивающей экспрессию целевого белка с антивирусными свойствами (рекомбинантного интерферона) в условиях *in vitro* и *in vivo*;
- генетическая модификация - трансформация плазмидой pBMB 105 с клонированным геном альфа 2 -интерферона не изменяет полезных свойств реципиентного штамма: антагонистической активности против широкого круга патогенных микроорганизмов и безвредности для теплокровных;
- разработана технология поверхностного культивирования рекомбинантных штаммов *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*, которая обеспечивает получение опытных партий препарата субалин-форте со стабильными характеристиками;
- применение препарата субалин-форте повышает хозяйственно-экономические показатели птицеводства.

Апробация работы Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: VIII международной конференции «Новые направления биотехнологии» (Москва, апрель 1998 г.); VIII международной конференции "Новые информационные технологии в медицине и экологии (Гурзуф, 2000); международной конференции «Проблемы биологической и экологической безопасности» (Оболensk, май 2000 г.); I международной конференции "Актуальные проблемы производства и переработки продуктов животноводства и птицеводства" (Уфа, 2000); международной научно-практической конференции «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и

перспективы» (Киров, 2001); международной научно-практической конференции «Пища. Экология. Качество» (Краснообск, февраль 2001 г.); 2-м московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003 г.).

Публикация результатов исследований По теме диссертации опубликовано 3 статьи в научных журналах, 1 статья в международном сборнике, 11 работ - в материалах российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 135 страницах. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Иллюстрирована 16 таблицами и 10 рисунками. Список литературы включает 196 источников, в том числе 120 иностранной литературы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты и методы исследований. В исследованиях использовали следующие культуры микроорганизмов: пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* BD170, *B. subtilis* 2335 ВКПМ 4579, *B. licheniformis* ВКПМ В 2336; тест-культуры *Salmonella typhimurium* 174, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* 209 из музея ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва). А также генетически модифицированные штаммы, из музея ИККМ ГНЦ ВБ «Вектор» (пгт.Кольцово): *B. licheniformis* 2336/pBMB105 (В-677); *B. subtilis* 2335/pBMB105 (ВКПМ-4579 В-315); *B. subtilis* BD170/pBMB105 (В-319).

При создании модельных инфекций были использованы вирусы: герпеса П-го типа, штамм MS (Государственная коллекция вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва).

Всего в работе использовали 20 морских свинок, 40 мышей и 31984 цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк». Все манипуляции с животными проводили с применением седативных средств в

соответствии с ветеринарным законодательством.

Эксперименты по молекулярному клонированию в бациллах проводили согласно /Гловер Д., 1988/ с собственными модификациями. Изменения были внесены в параметры (время, температура) инкубации с лизирующими агентами, связанные с особенностями клеточной стенки пробиотических штаммов.

Определение уровня синтеза интерферона клетками трансформированных бацилл проводили двумя методами: по ингибированию цитопатического действия вируса энцефаломиокардита (ЕМК) с использованием культуры клеток диплоидных фибробластов человека (ДФЧ-ДК-58) и иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием коммерческих наборов «ProCon IF2 plus», (г.Санкт-Петербург).

Стабильность плазмид в клетках бацилл изучали в экспериментах *in vitro* (при пассировании на культуральных средах) и оценивали по доле клеток, сохранивших исходную плазмиду. После пассажей проводили рассев культуры для получения изолированных клонов на агаризованной среде без антибиотиков. У 100-200 случайно отобранных клонов определяли сохранность фенотипа, детерминируемого наличием плазмиды (Km^r , INF^+). Сохранность встройки гена интерферона (структурную стабильность) определяли рестрикционным (по появлению рестрикционного PstI - EcoRI фрагмента длиной 700 н.п.), гибридизационным и ПЦР анализами. Стабильность рекомбинантных плазмид в трансформированных штаммах оценивали при пассировании на жидкой питательной среде LB /Маниатис Т. и др., 1984/ без антибиотика. Для этого 5 мкл ночной культуры исследуемых штаммов вносили в 5 мл свежей питательной среды и оставляли при 37°C в термостате до утра. Одно суточное выращивание (пассаж) соответствует примерно 12-14 клеточным генерациям /Denich K. et al., 1993/. Операцию повторяли десятикратно. Через 1, 3, 5, 10 пассажей проводили высевы культуры на твердую питательную среду и определяли процентное количество бактерий, сохранивших плазмиду.

Изучение антогонистических свойств у рекомбинантного штамма проводили методами отстроченного антогонизма -

радиальных и перпендикулярных штрихов, и агаровых блочков /Егоров Н.С., 1979/. Для культивирования штамма-антагониста были использованы следующие среды: среда Гаузе2, сусло-агар, и картофельный агар.

Патогенность, вирулентность и токсичность сконструированного штамма *B.licheniformis* 2336/pBMB105 изучали по методу Биргер М.О. (1982) на белых мышах при внутрибрюшинном, подкожном и пероральном введении 24 часовой культуры, выращенной на МПА или агаризованной среде Гаузе 2 с канамицином (10-20 мкг/мл). По истечении срока наблюдения животных умерщвляли, вскрывали и органы подвергали макроскопическому исследованию. Исследования проводили совместно с ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва).

Антивирусную активность рекомбинантного штамма изучали совместно с лабораторией Игнатьева Г.М. (ГНЦ ВБ «Вектор», пгт. Кольцово) на модельных инфекциях лабораторных животных (морские свинки). Исследуемые штаммы *B.licheniformis* (рекомбинантный, ИФН⁺ и реципиентный, ИФН⁻) в дозе 10⁹ кл/мл вводили перорально, за сутки до заражения. Контрольным животным вводили 0,85%-ый раствор NaCl.

Исследование эффективности субалина-форте в птицеводстве исследовали на цыплятах-бройлерах кросса «Сибиряк». Выращивание цыплят с суточного до 42-дневного возраста осуществлялось в клеточных батареях типа БКМ-3Б. Технологические параметры выращивания бройлеров по плотности посадки, фронту кормления и поения, температурному и световому режимам соответствовали нормам, принятым в хозяйстве. В схему кормления были включены антибиотики. Пробиотики давали с водой. Предварительно готовили препарат: 5 г сухого концентрата, содержащего $(8,5 \pm 1,5) \times 10^{11}$ к.о.с/г растворяли в 500 мл питьевой воды, тщательно перемешивая. Полученную гомогенную суспензию выливали в специальный бак, емкостью 80 л. Таким образом, на каждого цыпленка в среднем приходилось 0,02 дозы препарата (1 доза составляет $5,0 \times 10^9$ к.о.е.). Клетки батареи БКМ-3М оборудованы ниппельными поилками. На время выпаивания пробиотиков бак подключали к системе поилок. Цыплята выпивали

воду в течение 2-3 часов, после чего поилки подключали к системе водоснабжения. Препараты давали двумя курсами по 5 дней: первый курс проводили в первую неделю жизни, второй - с 28-30 дня жизни цыплят.

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента/Лакин Г.Ф., 1980/.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Конструирование генетически модифицированного штамма *Bacillus licheniformis* 2336/pBMB105 для разработки нового пробиотического препарата

В работе использовали плазмиду pBMB105, сконструированную в ГНЦ ВБ «Вектор» /Красных В.Н. и др., 1984; Щелкунов С. Н., 1986/, структура которой представлена на рисунке 1. Плазмида содержит химико-синтетический аналог гена интерферона человека типа альфа 2 /Колосов В.Н. и др., 1984/.

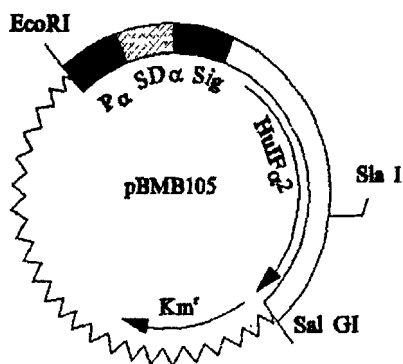


Рисунок 1. Рестрикционная и генетическая карта плазмиды pBMB 105

Примечание: P_{α} - промотор гена альфа-амилазы; SD_{α} область Шайна-Дальгарно (Shine-Dalgarno); $HuIF_{\alpha}2$ ~ ген ИФН- α 2 человека; Km^R - ген устойчивости к канамицину.

В качестве бактериального вектора доставки интерферона в организм был выбран пробиотический штамм *Bacillus licheniformis* 2336. Этот штамм широко применяется в медицине и ветеринарии в составе препаратов биоспорин и bacterin-SL, является хорошо изученным и безвредным для человека, теплокровных животных и окружающей среды /Смирнов В.В., 1993; Сорокулова И.Б., 1997/.

Нами была проведена трансформация компетентных клеток штамма *Bacillus licheniformis* 2336 плазмидой рВМВ 105 /Клонирование ДНК. Методы, 1988/. Сравнительная эффективность трансформации различных штаммов бацилл представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнительная эффективность трансформации компетентных клеток штаммов *Bacillus* плазмидой рВМВ105

Штамм	Эффективность трансформации, (на 1 мкг ДНК)
<i>Bacillus subtilis</i> BD170	$(6,7 \pm 0,5) \times 10^4$
<i>Bacillus subtilis</i> 2335	$(4,0 \pm 0,8) \times 10^2$
<i>Bacillus licheniformis</i> 2336	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^2^*$

* Примечание: использовали 10 мкг плазмидной ДНК

Эффективность трансформации штамма *B. licheniformis* 2336 была на два порядка ниже, по сравнению с лабораторным штаммом *B. subtilis* BD170, что возможно, связано с эндонуклеазной активностью и/или с особенностью репликации плазмиды рВМВ105 на молекулярном уровне в клетках *B.licheniformis*. Анализ трансформантов показал, что в исследуемых клетках пробиотических штаммов (для анализа брали не менее 10 клонов от каждого из них) присутствовала плазмидная ДНК, которая не отличалась по молекулярной массе и данным рестрикционного анализа от плазмиды рВМВ 105.

Синтез интерферона пробиотическими штаммами бацилл анализировали в образцах супернатантов культуральной жидкости, так как именно появление внеклеточного интерферона создает предпосылки для его биологических эффектов в организме при введении в составе реплицирующегося вектора. В таблице 2 приведены данные по уровню экспрессии клонированных генов в трансформированных штаммах бацилл.

Таблица 2 - Сравнительная характеристика трансформантов пробиотических штаммов по уровню экспрессии клонированных генов

Штаммы	Экспрессия клонированных генов		
	интерферон, МЕ/мл к.ж.		Канамицин- трансфераза (по МИК _{км}), мкг/мл
	По цитопатичес- кому действию	По ИФА	
<i>B.subtilis</i> BD170/pBMB105	$(1,3 \pm 0,9) \times 10^4$	$(3,1 \pm 1,3) \times 10^4$	520 $\pm$ 10
<i>B.licheniformis</i> 2336/pBMB105	$(3,4 \pm 1,8) \times 10^2$	не определяли	50 $\pm$ 2
<i>B.licheniformis</i> 2336 (контроль)	отсутствует	отсутствует	<0,5
<i>B.subtilis</i> 2335/pBMB105	$(5,0 \pm 1,6) \times 10^3$	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^4$	1050 $\pm$ 20

Представленные в таблице 2 результаты свидетельствуют о том, что все трансформированные штаммы были способны осуществлять синтез внеклеточного интерферона на уровне 10^2 - 10^4 МЕ/мл, и уровень синтеза зависел от штамма реципиента. Это, вероятно связано с репликационными, экспрессионными, а также физиологическими особенностями штаммов. Значения уровня синтеза интерферона у *B.licheniformis* 2336/pBMB105 были ниже, чем у лабораторного штамма *B.subtilis* BD170/pBMB105 и *B.subtilis* 2335/pBMB105. Следует отметить, что наблюдалась корреляция между уровнем синтеза целевого белка и значением минимальной ингибирующей концентрации канамицина (МИК_{км}).

При исследовании стабильности плазмиды, экспрессии гена интерферона и жизнеспособности клеток в штамме *B.lichehiformis* 2336/pBMB105 была обнаружена значительная гетерогенность популяции по этим признакам, свидетельствовавшая о необходимости стабилизации клеточного состава трансформированного штамма для создания на его основе лечебно-профилактического препарата.

Для стабилизации штамма *B.licheniformis* 2336/pBMB105 использовали комплекс факторов: пассивирование клеток при повышенной температуре 39°C с последующим посевом на твердую агаризованную среду, содержащую предельную концентрацию канамицина (50 мкг/мл) и лиофильную сублимацию культуры для отсева ослабленных клеток и спор. Таким образом был получен селекционный вариант трансформированного штамма, в котором произошла стабилизация популяции по полезным признакам.

Одним из основных требований, предъявляемых к штаммам для пробиотических препаратов, является антагонистическая активность по отношению к патогенным и условнопатогенным микроорганизмам, обусловленная способностью продуцировать антибиотические и другие биологически активные вещества антимикробного действия /Бондаренко В.М., Горская Е.М., 1992; Nemsova R., 1997/. Поэтому после трансформации плазмидой pBMB105 реципиентного штамма *B.licheniformis* 2336 необходимо было проверить сохранность антагонистических свойств у рекомбинантного штамма.

В экспериментах *in vitro* было показано, что штамм *B.licheniformis* 2336/pBMB105 обладает выраженной специфической активностью в отношении ряда тест-культур патогенных и условнопатогенных штаммов (таблица 3).

Таблица 3 - Сравнительная антагонистическая активность пробиотических штаммов бацилл

Штамм-антагонист	антагонистическая активность по отношению к стандартным тест-культурам, по зоне подавления роста, мм			
	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> 174	<i>Staphylococcus aureus</i> 209	<i>Candida albicans</i>
<i>B.subtilis</i> 2335	18-23	15-18	24-26	21-23
<i>B.licheniformis</i> 2336	6-9	6-9	7-9	11-12
<i>B.licheniformis</i> 2336/pBMB105	6-10	6-9	5-8	10-12

Из данных таблицы 3 видно, что рекомбинантный штамм *B.licheniformis* 2336/pBMB105 сохранил антагонистические свойства реципиентного штамма по отношению к патогенным и условнопатогенным культурам, но они менее выражены, чем у штамма *B.subtilis* 2335, составляющего основу препарата субалин.

Антивирусные свойства рекомбинантного штамма *B.licheniformis* 2336/pBMB105 исследовали на модельной инфекции герпеса II типа морских свинок. Выбор инфекции был обусловлен прежде всего, ее высокой чувствительностью к лечению и профилактике препаратами интерферона /Чудновская Н.В. и др., 1995; Adams O. et al., 2004/, а также известными данными о том, что герпес часто является причиной развития вторичных бактериальных инфекций /Whitley R.J. et al., 2001/. Было показано, что защитное противовирусное действие у трансформированного штамма (рег ос + аппликация) в 2 раза выше по сравнению с реципиентным. Эти данные подтверждают, что *B.licheniformis* 2336/pBMB105 способен продуцировать ИФН в условиях *in vivo*, создавая потенциальные возможности проявления его антивирусной активности.

3.2. Создание консорциума генетически модифицированных штаммов *Bacillus* для препарата субалин-форте

При составлении консорциума из генетически модифицированных микроорганизмов рода *Bacillus*, продуцирующих ИФН- α , для повышения эффективности доставки целевого белка к различным участкам слизистых поверхностей ЖКТ использовали принцип комплементарности.

Известно, что отделы ЖКТ различаются по уровню аэрации. Штамм *B. licheniformis* 2336 является факультативным анаэробом в отличие от строго аэробного штамма *B. subtilis* 2335. Особенности физиологии роста трансформантов данных штаммов изучали в условиях периодического культивирования с использованием среды Спицайзена. Уровень концентрации растворенного кислорода задавали путем изменения оборотов качалки ($n=50$; 150 об/мин). В условиях недостатка кислорода ($n=50$) у *B. licheniformis*

2336/pBMB 105 наблюдали равномерный глубинный рост со значительным для таких условий выходом по влажной биомассе - $(3,5 \pm 0,3)$ г/л. Для *B. subtilis* 2335/pBMB 105 в этих условиях отметили лишь слабый рост со значительным автолизом клеток, выход по биомассе составил лишь $(2,0 \pm 0,3)$ г/л. При энергичном массообмене кислорода ($n=150$ об/мин) у обоих штаммов наблюдали интенсивный глубинный рост с максимальным выходом по влажной биомассе, но урожайность *B. subtilis* 2335/pBMB 105 была выше и составила $(7,5 \pm 0,8)$ г/л, для *B. licheniformis* 2336/pBMB105 - $(5,8 \pm 0,7)$ г/л. Изучение синтеза целевого белка трансформированными штаммами в условиях различной аэрации продемонстрировало, что при недостатке кислорода продуктивность факультативного анаэроба *B. licheniformis* 2336/pBMB 105 была выше, чем аэробного штамма *B. subtilis* 2335/pBMB105. Это свидетельствовало о способности обоих штаммов дополнять друг друга в микробном консорциуме, осуществляя синтез ИФН в различных биотопах ЖКТ, что создает предпосылки пролонгированного действия ИФН и, как следствие, повышения его специфической активности.

Жизнеспособность клеток бацилл как спорообразующих бактерий в значительной степени зависит от эффективности прорастания спор /Nicholson WL, 2002/. Время периода «скрытого прорастания» варьирует в зависимости от вида бактерий и температуры среды. Впоследствии прорастающая спора становится чувствительной и к другим факторам, таким как уровень аэрации, неоптимальные значения которой приводят к замедлению роста и автолизу /Амбулос Н., 1992/. Исследование эффективности прорастания спор при различных уровнях аэрации показало, что в условиях недостатка кислорода ($n=50$) прорастающие споры *B. subtilis* подвергаются автолизу, в то время как споры *B.licheniformis* 2336 активно образуют вегетативные клетки, увеличивая численность популяции.

Для оценки антагонистической активности консорциума из двух штаммов *Bacillus* мы провели эксперимент по «смешанному» культивированию штаммов-антагонистов с тест-культурой *Salmonella typhimurium* 174 в условиях различной аэрации на среде,

оптимальной для роста обеих культур (рисунок 2). На рисунке 2 видно, что антагонистическая активность такого строгого аэроба, каким является *B.subtilis* 2335, была максимальной в оптимальных для роста условиях (рисунок 2С). При уменьшении аэрации антагонистическая активность уменьшается, а при $n=0$ как и следовало ожидать, отсутствует. В то же время, в этих условиях *B.licheniformis* 2336 подавляет рост клеток тест-культуры, благодаря способности осуществлять свою жизнедеятельность и антагонистическую активность в условиях с пониженным содержанием кислорода.

3.3. Технология получения препарата субалин-форте

С целью оценки эффективности консорциума двух генетически модифицированных штаммов *Bacillus* как основы нового пробиотического препарата необходимо было разработать технологию его получения. С учетом опыта получения препарата субалин методом поверхностного культивирования, было наработано пять опытных серий препарата субалин-форте, характеристики которых отражены в таблице 4.

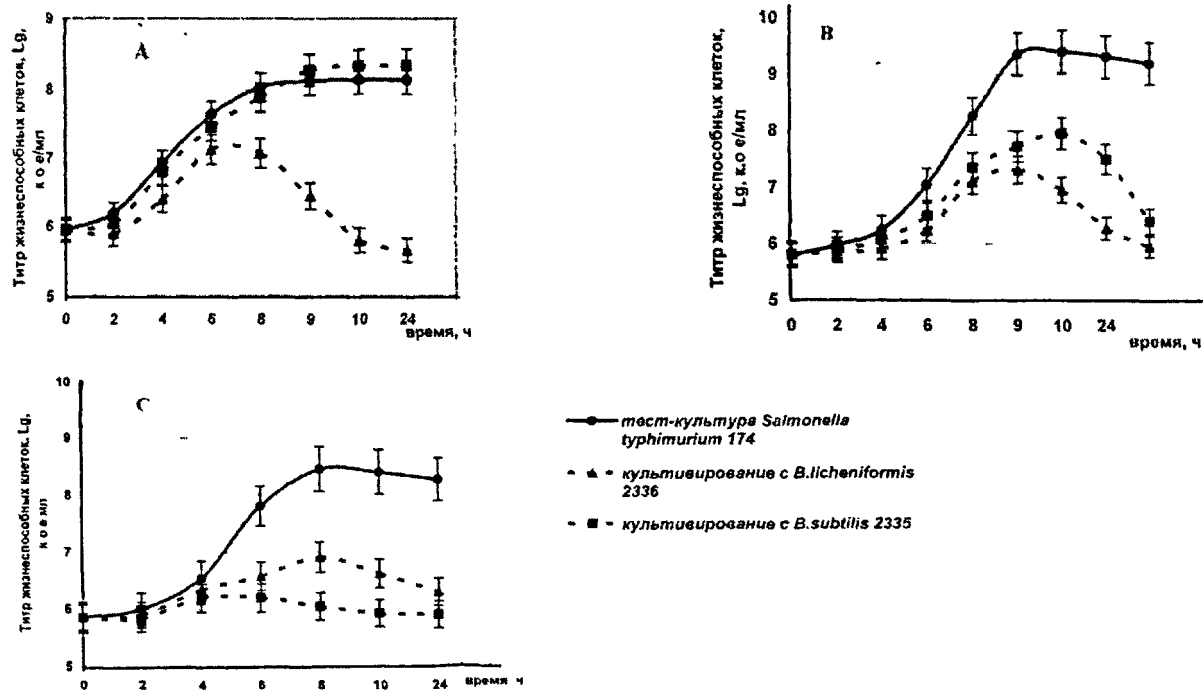


Рисунок 2. Влияние уровня аэрации на антагонистическую активность бацилл при «смешанном» культивировании с тест-культурой *Salmonella typhimurium* 174. А — $p=0$; В — $p=50$; С — $p=150$, где p — число оборотов качалки

На основе анализа полученных данных был разработан проект технических условий получения пробиотика субалин-форте ТУ 9383-021-00479979-01.

Таблица 4 - Характеристика опытных серий препарата субалин-форте

Наименование показателя	Серия 011098	Серия 021198	Серия 030299
Внешний вид препарата	Пористая масса молочно-белого цвета	Пористая масса кремоватого цвета	Пористая масса молочно-белого цвета
Специфическая (антагонистическая) активность по зоне подавления роста, мм	<i>Sh. sonnei</i> –7-8; <i>S.typhimurium</i> –8-9; <i>St. aureus</i> –7-8; <i>C.albicans</i> –11-12	<i>Sh. sonnei</i> –8-9; <i>S.typhimurium</i> –7-8; <i>St. aureus</i> –6-7; <i>C.albicans</i> –10-12	<i>Sh. sonnei</i> –7-9; <i>S.typhimurium</i> –6-8; <i>St. aureus</i> –7-8; <i>C.albicans</i> -12
Растворимость	Хорошо растворим в воде и физиологическом растворе		
рН водного раствора	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,2
Количество микробных клеток в одной дозе: <i>B.licheniformis</i> 2336/рВМВ105 <i>B.subtilis</i> 2335/рВМВ105	(1,2±0,3)х10 ⁹ (4,9±0,7)х10 ⁹	(0,9±0,2)х10 ⁹ (4,8±0,8)х10 ⁹	(1,0±0,4)х10 ⁹ (5,2±0,6)х10 ⁹
Подлинность	Содержит культуры: <i>B.subtilis</i> 2335/рВМВ 105 и <i>B.licheniformis</i> 2336/рВМВ 105		
Массовая доля влаги, %	3,7 ± 0,7	3,1 ± 0,3	3,6 ± 0,6
Контаминация посторонней микрофлорой	Не содержит посторонней микрофлоры		

Данный метод отличается простотой, позволяет получать препарат со стабильными характеристиками и высокой степенью сохранности плазмидной ДНК, что особенно важно при

культивировании трансформированных штаммов. Вместе с тем он не поддается автоматизации и является достаточно трудоемким, что, в конечном итоге, сказывается на себестоимости препарата. Использование метода глубинного культивирования позволит избежать указанных недостатков и повысить рентабельность производства. В связи с этим было проведено исследование параметров роста и сохранности плазмиды рекомбинантного штамма при периодическом культивировании в селективных (в присутствии антибиотика в среде культивирования) и неселективных условиях. Было показано, что рекомбинантный штамм имеет более низкие параметры роста в сравнении с реципиентным во всех условиях культивирования. В то же время сохранность плазмиды была максимально высокой - $(94,8 \pm 5,5)\%$ при выращивании в неселективных условиях в сравнении с селективными - $(77,6 \pm 2,4)\%$ при содержании канамицина в среде 20 мкг/мл. Следует отметить, что для разработки технологии получения препарата методом глубинного культивирования необходимы дополнительные эксперименты по масштабированию процесса.

3.4 Эффективность пробиотика субалин-форте в птицеводстве

Исследование эффективности нового пробиотического препарата субалин-форте, сконструированного на основе рекомбинантных штаммов *Bacillus*, проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Сибиряк» в условиях промышленного выращивания. С этой целью были сформированы опытная и контрольная группы. Препарат субалин-форте давали с водой из расчета 0,02 дозы на голову, что соответствует $5,0 \times 10^7$ к.о.е., двумя курсами, продолжительностью пять дней каждый. Первый курс проводили в первую неделю жизни, второй - с 26-28 суточного возраста, так как известно, что в эти периоды жизни молодняка закономерно снижается естественная резистентность и иммунная реактивность /Панин А.Н. и др., 1998/. Учет прироста живой массы проводили еженедельно, сохранность поголовья определяли по окончании эксперимента. Было показано, что

применение субалина-форте повышает сохранность поголовья до 3%, увеличивает прирост живой массы на 9,6%. Прибыль и уровень рентабельности производства мяса цыплят-бройлеров возросли на 45,8% и 19,5% соответственно (таблица 5).

Таблица 5 - Экономические показатели применения субалина-форте

№ п/п	Показатели	Контрольная группа	Опытная группа
1	Продолжительность опыта, дни	42	42
2	Поголовье на начало опыта, голов	6000	6000
3	Сохранность поголовья, % голов	93,7 5622	96,7 5802
4	Среднесуточный прирост массы, г	38,8	43,3
5	Убойная масса, кг	5670,35	6582,95
6	Реализационная цена мяса, руб.	34	34
7	Выручка от реализации, тыс. руб.	1927	2238
8	Прибыль, тыс. руб.	723,7	991,8
9	Уровень рентабельности, %	60,1	79,5

В дальнейшем было проведено сравнение эффективности двух пробиотических препаратов на основе рекомбинантных штаммов *Bacillus* - субалина и субалина-форте. Препарат субалин в этом случае служил положительным контролем, так как его эффективность в птицеводстве была показана ранее /Белявская В.А., 2002/. Были сформированы две опытных и одна контрольная

группы цыплят по 8640 голов каждая. Условия эксперимента соответствовали описанным выше. Полученные результаты показали, что сохранность цыплят и среднесуточные привесы в опытных группах были выше, чем в контрольной группе. Для препарата субалин среднесуточные привесы увеличились на 5,5% по сравнению с контрольной группой, для субалина-форте - на 14,7%. Сохранность цыплят в обеих контрольных группах превышала таковую в контрольной группе. Рентабельность производства и прибыль у препарата субалин-форте были выше, чем у препарата субалин и составили 19,5% и 45,8% против 7,9% и 21,3% соответственно. Таким образом, субалин-форте оказался более эффективным по сравнению с препаратом субалин.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирован пробиотический штамм *B.licheniformis* 2336/pBMB 105, способный продуцировать интерферон альфа 2 человека.

2. Показано, что полученный трансформированный штамм стабильно сохраняет плазмиду, обеспечивая экспрессию целевого белка в условиях *in vitro* и *in vivo*.

3. Экспериментально показано, что генетическая модификация - наличие плазмиды pBMB 105, кодирующей синтез интерферона альфа 2 человека, не изменила полезных антагонистических свойств реципиентного штамма и обеспечила рекомбинантному штамму способность к синтезу интерферона, что создает предпосылки для проявления антивирусной активности.

4. Экспериментально показано, что пробиотический штамм *B.licheniformis* 2336 является перспективным для составления микробного консорциума со штаммом *B.subtilis* 2335, так как дополняет свойства последнего. Сконструированный на его основе рекомбинантный *Bacillus licheniformis* 2336/pBMB 105 способен к росту и продукции целевого белка в условиях недостатка кислорода. Это обеспечивает эффективность действия препарата субалин-форте в отделах ЖКТ с различной степенью аэрации.

5. Разработана технология и проект технических условий получения пробиотического препарата субалин-форте методом поверхностного культивирования с последующим лиофильным высушиванием.

6. Экспериментально показана эффективность применения препарата субалин-форте при выращивании цыплят-бройлеров кросса «Сибиряк». Субалин-форте повышает сохранность птицы до 3%, прирост живой массы - до 9,6%, прибыль и уровень рентабельности - на 48,5% и 19,5% соответственно.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние интродукции генетически модифицированных микроорганизмов (ГММО) на микроэкологию желудочно-кишечного тракта теплокровных / Соавт.: В.А. Белявская, Н.Г. Ромашова, Л.К. Федосова, И.Б. Сорокулова // Новые направления биотехнологии: Тез.докл. 8-й конф. - М., 1998. - С. 103.
2. Интродукция популяций плазмидного и бесплазмидного штаммов *Bac.subtillis* в лабораторные водные микрокосмы с различной длиной трофической цепи / Т.Ю. Крылова, Л.Ю. Попова, А.А. Шитц, В.А. Белявская // Новые направления биотехнологии: Тез.докл. 8-й конф., - М., 1998. - С. 108.
3. Экспериментальный подход к оценке плазмидного профиля аборигенной микрофлоры модельных и природных экосистем / Соавт.: Т.Н. Лобова, Е.Е. Максимова, Л.Ю. Попова, В.А. Белявская // Новые направления биотехнологии: Тез.докл. 8-й конф. - М., 1998. - С. 109.
4. Патент РФ № 2172343 Штамм бактерий *Bacillus licheniformis*, обладающий антивирусной и антибактериальной активностью. - 1998 / Белявская В.А., Кашперова Т.А., Сорокулова И.Б., Смирнов В.В., Ильичев А.А., Панин А.Н., Малик Н.И., Сандахчиев Л.С.
5. Патент РФ № 2159625 Пробиотический препарат комплексного действия. - 1999 / Белявская В.А., Сорокулова И.Б., Ромашова Н.Г., Кашперова Т.А., Масычева В.И., Ильичев А.А., Щелкунов С.Н., Данилюк Н.К., Нестеров А.Е., Сандахчиев Л.С., Смирнов В.В., Петренко В.А., Красных В.Н. / БИ N 33 от 27.11.00.
6. Изучение гетерогенности в популяциях плазмидсодержащего и бесплазмидного штаммов *Bacillus subtilis* в разных условиях существования / Соавт.: Т.Ю. Крылова, Л.Ю. Попова, Н.С. Печуркин, В.А. Белявская // Микробиология.- 2 000. - Т.69, № 2. - С.270-273.
7. Многоуровневое исследование экологической безопасности генно-инженерно-модифицированных *Bacillus subtilis* с использованием модельных экосистем / Соавт.: В.А. Белявская, Л.Ю. Попова, И.Б. Сорокулова, Н.И. Малик // Новые информационные технологии в медицине и экологии: 8-я

междунар.конф.и дискус. Науч.клуб, Гурзуф - Запорожье, 2000. - С.103, J.13.

8. Применение субалина в промышленном птицеводстве бройлерного направления / Соавт.: В.А. Белявская, Н.С. Хрусталева, К.Я. Мотовилов // Актуальные проблемы производства и переработки продуктов животноводства и птицеводства: Сб. научных трудов по материалам Первой Междунар. конф. (Уфа, 17-18 окт. 2000 г.). - Уфа, 2000. - С.150-153.

9. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерно-модифицированных *Bacillus subtilis* с использованием модельных экосистем /Соавт.: В.А. Белявская, Л.Ю. Попова, И.Б. Сорокулова, Н.И. Малик // Проблемы биологической и экологической безопасности: Междунар. конф., Тез.докл.: - Оболенск, 2000. - С.357-358.

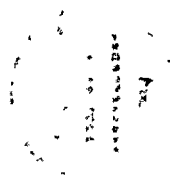
10. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма *Bacillus subtilis*, продуцирующего интерферон альфа 2 человека / Соавт.: В.А. Белявская, В.М. Бондаренко, А.А. Ильичев и др. // Журн. Микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2001. - №2. - С.16-20.

11. Опыт применения нового пробиотика субалина-форте на основе ***Bacillus subtilis*** и ***Bacillus licheniformis*** в промышленном птицеводстве /Соавт.: В.А. Белявская, Н.С. Хрусталева, К.Я. Мотовилов //Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы: Материалы научно-практической конф. (Киров, 22-23 мая 2001 г.). - Киров, 2001. - С. 31-32.

12. Опыт применения препарата субалин в профилактике диарей и стресса в промышленном птицеводстве / Соавт.: В.А. Белявская, Н.С. Хрусталева, К.Я. Мотовилов // Пища. Экология. Качество: Сб. материалов междунар. научно-практической конф. (Краснообск, 26-27 февраля 2001 г.). - Новосибирск, 2001. - С. 87-88.

13. Испытание нового пробиотика субалина-форте в промышленном птицеводстве / Соавт.: В.А. Белявская, Н.С. Хрусталева, К.Я. Мотовилов // Пища. Экология. Качество: Сб. материалов междунар. научно-практической конф. (Краснообск, 26-27 февраля 2001 г.). - Новосибирск, 2001. - С.89.

14. Применение пробиотических препаратов в промышленном птицеводстве /Соавт.: Н.С. Хрусталева, О.М. Незнамова //Труды НГАУ, Новосибирск, 2003. - С.277-281.
15. Биотехнологические аспекты конструирования генетически модифицированных микроорганизмов для создания лечебно-профилактических препаратов / Соавт.: В.А. Белявская, В.И. Масычева // Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 2-го московского междунар. конгресса, (Тез.докл.): В 2-х ч.- М., 2003. - Ч.1. -С.96.
16. Конструирование генетически модифицированных микроорганизмов для разработки нового поколения иммунобиологических и вакцинных препаратов / Соавт.: Н.Г. Ромашова, А.В. Нестеров, Л.Р. Лебедев, В.А. Белявская // Биотехнология. - 2004. - № 5. - С.39-48.
17. Biotechnological aspects of designing genetically modified microorganisms / Co-auth.: V.A. Belyavskaya, L.R. Lebedev, V.I. Masycheva // Biotechnology and Medicine editor G.E. Zaikov et al.- Nova Science Publishers, Inc., New York.- 2004.- P.107-119.



07 МАЙ 2005

718