



УДК 579.083.13

## ОЦЕНКА НЕКОТОРЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS SUBTILIS*

*М.Ж. Мынбаева, С.С. Ануарбекова, К.Х. Алмагамбетов*

[lcm@biocenter.kz](mailto:lcm@biocenter.kz)

ДГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», г. Астана

В данной работе представлены результаты изучения адгезивной, протеолитической, антагонистической активности и антибиотикочувствительности 47 бактерий рода *Bacillus*, выделенных из почвы, растений, зерна пшеницы, муки и хлебобулочных изделий. В результате было получено, что исследованные культуры высокоадгезивные к эритроцитам барана, обладают протеолитической активностью и антагонистической активностью по отношению ко всем изученным в работе условно-патогенным микроорганизмам. Все культуры были чувствительны к офлоксацину, амоксиклаву, рокситромицину, гентамицину.

Пробиотики - это бактериальные препараты из живых микробных культур, предназначенные для коррекции микрофлоры хозяина и лечения ряда заболеваний. Они в отличие от антибиотиков не оказывают отрицательного воздействия на нормальную микрофлору, поэтому их широко применяют для профилактики и лечения дисбактериозов. В то же время эти биопрепараты характеризуются выраженным клиническим эффектом при лечении (реконвалесценции) ряда острых кишечных инфекций. Много лет в медицине широко используются лактобактерин, бифидум-бактерин, колибактерин, бификол, ацилакт и другие, основой которых являются бактерии рода *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и вида *Escherichia coli* [1, 2].

Во всем мире ведутся масштабные исследования по созданию новых, более активных пробиотиков. В последнее время ведутся работы по использованию в качестве источников пробиотического препарата бактерий рода *Bacillus*, на их основе разработано более десятка эффективных препаратов: биоспорин, гинеспорин, споробактерин, бактиспорин, энтерогермин, флонивин, бактисубтил, це-реобиоген. Они эффективно применяются в медицинской практике для лечения стоматитов, гингивитов, ревматических артритов, гнойных осложнений в хирургии, в гинекологии, инфекционных заболеваний,

энтеритов, дисбактериозов, также эффективно используются в ветеринарии [3-9].

Итак, разработан целый ряд пробиотиков из бацилл для ветеринарии и медицины, однако продолжается поиск продуцентов с целью получения препаратов с новыми или улучшенными свойствами.

Таким образом, перед нами была поставлена задача, которая заключалась в поиске бацилл с возможными пробиотическими свойствами.

### Материалы и методы

В работе использовались 47 изолятов бацилл, выделенных из различных экологических ниш. По фенотипическим признакам и результатам секвенирования с использованием 16S рРНК они были отнесены к виду *Bacillus subtilis*. Нами были изучены адгезия, протеолитическая активность, антагонизм к различным условно-патогенным микроорганизмам и чувствительность к антибиотикам.

*Метод оценки адгезии по J.P. Duguid, в модификации Н.Н. Костюковой*

Для оценки адгезивной активности использовали смыв культуры густотой 5 ЕД по оптическому стандарту ГИСК им. Л.А. Тарасевича и 0,5% взвесь эритроцитов человека, барана, курицы. В U-образные лунки планшета Такачи вносили разведения культуры в объеме 0,025 мл, в 1 лунку -



цельную взвесь, затем титровали путем последующего переноса по 0,025 мл для получения разведений 1:2, 1:4 и 1:8. Закапывали 0,5% взвесь эритроцитов в объеме, равном объему взвеси культуры. Смеси выдерживали 2 часа при температуре 37°C, затем оставляли на ночь при 4°C [10].

#### *Метод определения протеолитической активности*

К 100 мл стерильного питательного агара добавляли 30 мл снятого стерильного молока, затем разливали в чашки Петри. Исследуемые культуры микробов засеивали бляшками (18-24 часа при 37°C).

Бактерии, продуцирующие протеолитический фермент, провоцируют пептонизацию молочного белка - казеина, в результате чего вокруг этих колоний образуются прозрачные зоны, четко выделяющиеся на общем молочно-мутном фоне среды [10, 11].

#### *Метод определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам*

Для определения чувствительности микробов к антибиотикам использовался метод диффузии в агар с применением дисков. Для засева чашек используют чаще всего 18-20-часовые (при интенсивном росте 4-5-часовые, при замедленном росте 2-3-суточные) бульонные и агаровые культуры микробов. Из агаровых культур готовят микробную взвесь, содержащую 1 млрд. микробных тел в 1 мл.

На поверхность подсушенной среды наносят исследуемую культуру микробов в объеме 1 мл. Посредством покачивания чашки культуру равномерно распределяют по поверхности среды с последующим отсасыванием избытка жидкости пипеткой. Засеянные чашки 30-40 мин подсушивают при комнатной температуре, затем на поверхность засеянной и подсушенной среды с помощью стерильного остроконечного пинцета кладут диски, пропитанные разными антибиотиками. Каждая чашка может служить для одновременного испытания штамма к действию 5-6

антибиотиков. Засеянные чашки с нанесенными на них дисками на 18-24 ч помещают в термостат при 37°C вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посевов.

Бактерии, чувствительные к антибиотикам, образуют вокруг соответствующих дисков зоны угнетения роста.

По степени чувствительности бактерии были разделены на чувствительные, умеренно устойчивые и устойчивые [12, 13].

#### *Метод определения антагонистической активности*

Суточную культуру пересеивали петлей методом укола на чашки Петри с 2% мясопептонным агаром (МПА). После суточной инкубации при 37°C, с целью уничтожения выросших культур, чашку Петри выдерживали в парах хлороформа (1 мл на крышку чашки) 30 минут, проветривали 20 минут. Затем поверхность чашек заливали вторым тонким слоем расплавленного и остуженного до 46°C 0,7% МПА, смешанной с взвесью индикаторной культуры (0,1 мл взвеси индикаторной культуры бактерий в концентрации  $1 \times 10^9$  мкр.кл./мл). Об антагонистической активности судили по зоне отсутствия роста тест-штаммов вокруг колонии испытуемого штамма бацилл.

Антагонистическая активность исследованных культур бацилл считалась нулевой при ширине зоны отсутствия роста тест-штаммов до 1,0 мм, низкой – при 1,1-4,9 мм, средней - при 5,0-8,9 мм, высокой – при 9,0 мм и более [14].

### **Результаты и обсуждения**

Нами была изучена адгезивная активность у штаммов бацилл к эритроцитам человека, барана, курицы. На рисунке 1 продемонстрирована реакция адгезии на стекле с эритроцитами человека.

Это качественная реакция, по которой можно определить, обладают ли изучаемые объекты способностью взаимодействовать с объектами, имеющими идентичные сайты узнавания.



Все культуры обладали способностью к адгезии с клетками крови данных макроорганизмов.

В дальнейшем адгезивную активность изучали в реакции гемагглютинации по J.P. Duguid, в модификации Н.Н. Костюковой, по результатам которой мы можем оценить степень адгезивной активности.

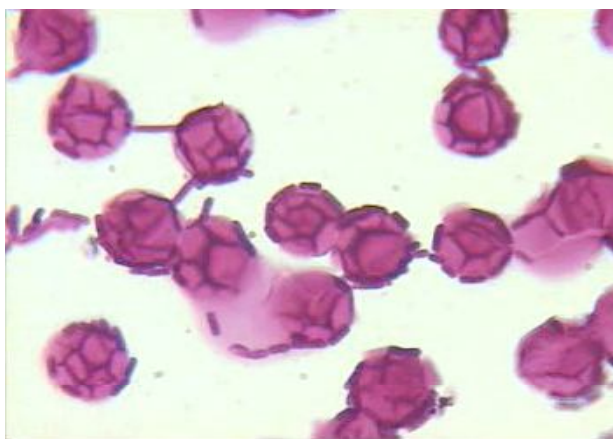


Рис. 1. Реакция адгезии клеток бацилл с эритроцитами человека на стекле

По степени адгезии штаммы были разделены на три группы: слабоадгезивные – агглютинирующие эритроциты только в неразведенной взвеси, среднеадгезивные, дающие гемагглютинацию в разведении взвеси 1:2 и 1:4, и высокоадгезивные, вызывающие гемагглютинацию в разведении 1:8.

При этом высокую степень адгезии показали: к эритроцитам барана – все изоляты, к эритроцитам человека – 14, к эритроцитам курицы – 18 исследованных культур бацилл.

Таким образом, более активные из 47 являются 14, которые подвергнутся дальнейшему анализу с учетом оценки других свойств.

Протеолиз – это процесс расщепления белков и пептидов в организме с участием специальных ферментов. Одна из важнейших ролей протеолиза состоит в том, что он приводит к необратимой инактивации белков и, таким образом, участвует в кругообороте белков в клетке. Существует множество ферментов, осуществляющих протеолиз – это разнообразные протеазы (лизосомные,

митохондриальные, кальций-зависимые и др.), а также сложные белковые комплексы, «протеасомы». У эукариот протеасомы присутствуют в цитозоле и ядрах. Протеолитические ферменты в комплексе с другими свойствами микроорганизма оказывают пробиотический эффект, но также могут применяться самостоятельно в лечении различных заболеваний.

Протеолитическая активность, определенная на молочном агаре Эйкмана, проявилась у всех 47 исследуемых культур. Наиболее активные штаммы: *Bacillus subtilis* 5 ПП, 7 ПП, 33 ПП, 37 ПП, 42 ПП, 45 ПП, 46 ПП, 47 ПП. По полученным результатам мы разделили их на высокую степень – 9 штаммов с зоной протеолиза от 25 до 43 мм, среднюю – 34 штамма с зоной протеолиза от 15 до 25 мм и низкую – 4 штамма с зоной протеолиза от 15 до 10 мм (рис. 2).

Основной проблемой последних лет является широкое распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков. Главную, а порой и решающую роль в эффективности лечения играет определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам. Для изучения чувствительности бацилл к антибиотикам были использованы 7 антибиотиков: офлоксацин – группа фторхинолонов, амоксилав – группа аминопенициллинов, полимиксин – группа полипептидов, линкомицин – группа линкозамидов, рокситромицин – группа макролидов, гентамицин – группа аминоглюкозидов, цефазолин – группа цефалоспоринов 2-го поколения, результаты этой части работы отражены в таблице 1.

Все исследуемые культуры обладали антибиотикочувствительностью. В основном исследуемые штаммы были чувствительны к офлоксацину, амоксиклаву, рокситромицину, гентамицину. К полимиксину и цефазолину бациллы были чувствительны и умеренно устойчивыми. А к линкомицину основная часть исследованных культур были устойчивы, умеренно устойчивые и небольшое количество чувствительны.



Таблица 1

Изучение чувствительности к антибиотикам штаммов *Bacillus subtilis*

Наименование антибиотика	Контроль			Опыт		
	абс	Зона задержки роста (мм)	%	абс	Зона задержки роста (мм)	%
Офлоксацин	6	32±0,7	100	47	35±0,3*	100
Амоксицилин	6	27±1,0	100	47	29±0,5**	100
Рокситромицин	6	29±0,6	100	47	32±0,3*	100
Гентамицин	6	29±0,6	100	47	30±0,3**	100
Линкомицин	6	18±1,0	100	47	20±0,4	100
Цефазолин	6	17±1,0	100	47	20±0,4**	100
Полимиксин	6	11±0,7	100	47	13±0,2***	100

Примечание: \* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,02$

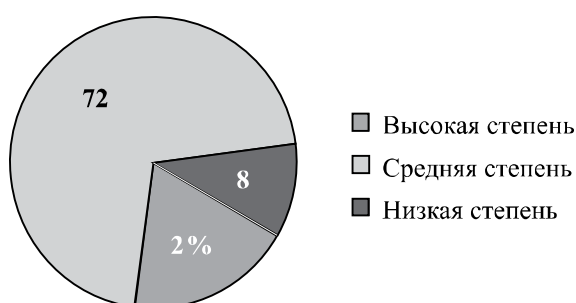


Рис. 2. Протеолитическая активность бацилл на молочном агаре Эйкмана

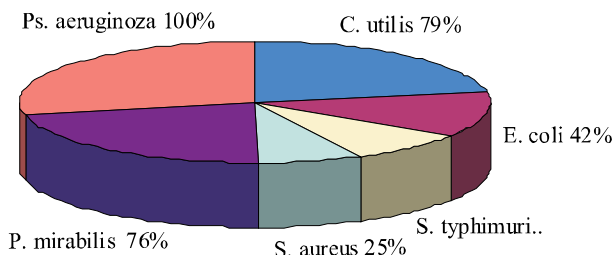


Рис. 3. Антагонистическая активность бацилл, выделенных из различных экологических ниш

Антагонизм – одна из составляющих пробиотического действия микроорганизмов. Антагонистическая активность определялась методом отсроченного антагонизма.

Была изучена антагонистическая активность бацилл, выделенных из различных экологических ниш по отношению к тест-культурам: *C. utilis* ЛИА-01 Y-BRM – 0097, *E. coli* 157 B-BRM – 0040, *S. typhimurium* TA – 98 B-BRM – 0162, *S. aureus* 6538 B-BRM – 0039, *P. mirabilis* 257 B-BRM – 0037, находящихся на хранении в Республиканской коллекции микроорганизмов. Также антагонистическую активность изучали к кли-

нической культуре *Ps. aeruginosa*, выделенной из кишечника больного (рис. 3).

Нами установлено, что антагонистической активностью обладают культуры по отношению ко всем изученным в работе условно-патогенным микроорганизмам.

Получены следующие результаты. Все бациллы подавляли *Ps. aeruginosa* – 100%, размеры зоны колебались в пределах 10-21 мм. *C. utilis* подавляли 79% штаммов, размеры зоны колебались в пределах 2-17 мм. Количество активных штаммов по отношению к *P. mirabilis* составило 76%, размеры зоны колебались в пределах 6-60 мм. К *E. coli* активность проявили 42%, что соответствовало 20 штаммам, размеры же зоны колебались в пределах 2-16 мм. 13 штаммов бацилл были активны по отношению *S. typhimurium*, соответственно это составило 28%, размеры зоны колебались в пределах 1-11 мм. К *S. aureus* антагонизм проявили 25% изученных нами бацилл, т.е. 12 штаммов, размеры зоны колебались в пределах 3-40 мм.

Таким образом, в результате данной работы была изучена адгезивная, протеолитическая, антагонистическая активность и антибиотикочувствительность, которая выявила следующее: все изученные культуры обладали всеми изученными свойствами и подтверждается факт чувствительности культур к антибиотикам нового поколения и постепенное развитие устойчивости.

Подводя итоги исследования, можно утверждать о перспективности проводимых



исследований с целью разработки сырья экологии кишечника человека и укрепления для биологически активных продуктов, его иммунной системы. способствующих нормализации микро-

### Литература

1. Подгорский В.С., Лясковский Т.В. Рекомендации международных организаций по оценке пробиотических свойств препаратов // Микробиол. журн. - 2005. - 67, №6. - С. 104-109.
2. Смирнов В.В., Подгорский В.С., Коваленко Н.К. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // Микробиол. журн. - 2002. - 64, № 4. - С. 62-80.
3. Шендеров Б.А. Социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных // Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 2. - М.: ГРАНТЬ, 1998. - 416 с.
4. Ноздрин Г.Л., Крачковская В.А., Наумкин И.В. и др. // Акт. вопр. ветеринарии / Тез. докл. науч.-практ. конф. факультета вет. мед. - Новосибирск: НГАУ, 1997. - С. 20-21.
5. Осипова И.Г., Сорокулова И.Б. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков // Журн. микробиол., эпидемиол. - 1998. - № 6: - С. 68-71.
6. Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б. Биологические свойства спорных аэробных бактерий, выделенных из организма человека и животных / Фитонциды. - Киев: Наукова думка, 1981. - С. 35-40.
7. Белявская В.А., Чердынцева Н.В., Бондаренко В.М. и др. Биологические аспекты интерферона, продуцируемого рекомбинантными бактериями препарата пробиотика Субалина / Журн. микробиол., 2003, №2. - С. 102-109.
8. Методы определения патогенных свойств возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний: Метод. рекомен. для студ. мед. вузов и врачей инфекционистов, микробиологов, эпидемиологов, гигиенистов / Под ред. Ш.И. Сарбасовой. - Астана, 2000. - 19 с.
9. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / Изд. 4-е, перераб. и доп. - М.: Медицина, 1978. - 394 с.
10. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. - М.: Медицина, 1982. - С. 168.
11. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агаре с использованием дисков. Министерство здравоохранения СССР. - М., 1983.
12. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Академия, 2005. - 608 с

### Түйін

Бұл жұмыста топырақтан, өсімдіктерден, бидай дәндерінен, ұннан және нан өнімдерінен бөлініп алынған *Bacillus* туысына жататын 47 бактериялардың адгезивты, протеолитикалық, антагонистикалық белсенділігіне және антибиотиктерге сезімталдығына тексеру нәтижелері берілген. Соның нәтижесінде зерттелген культуралар қой эритроциттеріне жоғары адгезивтілік көрсетті және жұмыс барысында қолданылған барлық шартты – патогенді микроорганизмдердің протеолитикалық және антагонистік белсенділігі анықталды. Офлоксацин, амоксицилин, рокситромицин, гентамицинге барлық культуралар сезімтал болды.

### Summary

In this article was given results of study of adhesion, proteolytic, antagonistic activity and sensitivity to antibiotic of 47 strains of *Bacillus* spp. isolated from the soils, plants, wheat flour and wheat's granules. This study have show, that studied cultures have high adhesive property to sheeps red blood cells and have an antagonistic and proteolytic activity to the all studied conditionally pathogenic microorganisms. All studied cultures had high sensitivity to the number of antibiotics: ofloxacin, amoxylave, roxytromycine and gentamycine.