

УДК 328

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА
BACILLUS**

С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, Москва

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время перспективными по терапевтическому потенциалу лекарственными средствами для коррекции дисбиоза являются метабиотики – препараты на основе продуктов жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов [1, 2].

В этом аспекте представляют интерес бактерии рода *Bacillus*, метаболиты которых могут оказывать положительные эффекты на макроорганизм [3, 4].

Механизм пробиотического действия бацилл связан с синтезом антибиотикоподобных веществ с широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов [5]. По своей структуре они близки к противомикробным пептидам, синтезируемым в организме человека. Их действие направлено на формирование мембранных пор, приводящих к гибели патогенных бактерий, что делает невозможным формирование устойчивости к препаратам на их основе [6]. Этот факт позволяет предположить, что при использовании метабиотиков может быть решена проблема антибиотикорезистентности условно патогенных микроорганизмов – возбудителей различных инфекций (в том числе ВБИ). Кроме того, препараты на основе метаболитов бактерий рода *Bacillus* по сравнению с антибиотиками будут лишены побочных эффектов [7], что делает возможным их применение больным со сниженным иммунитетом, в случае необходимости проведения противомикробной терапии.

Известно, что бактерии рода *Bacillus*, а в частности *B. Subtilis*, продуцируют ферменты различных классов, активность которых зависит от индивидуальных особенностей штаммов. Особенно хорошо развита у этих микроорганизмов система гидролаз [8]. О высокой активности ферментов свидетельствует тот факт, что бактерии рода *Bacillus* используют в пищевой промышленности для ферментативной обработки изготавливаемых продуктов, снижая их аллергенный потенциал [9].

Подбор наиболее функциональных штаммов бактерий рода *Bacillus* или их консорциума поможет в дальнейшем создать новый биопрепарат–метабиотик с широким терапевтическим диапазоном.

Ранее в ФГБНУ НИИВС им. Мечникова РАМН были выделены и охарактеризованы штаммы *Bacillus*, обладающие высокой антагонистической активностью в отношении широкого круга условно патогенных бактерий и грибов: *Bacillus subtilis* 1719, *Bacillus subtilis* 3Н, *Bacillus Pumillus* «Пашков» [10–12]. Однако их ферментативные свойства были изучены не достаточно.

Целью проведенных исследований явилась сравнительная оценка ферментативной активности штаммов: *Bacillus Pumillus* «Пашков» и *Bacillus subtilis* 1719 и 3Н.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили штаммы: *Bacillus Pumillus* «Пашков», *Bacillus subtilis* 1719, *Bacillus subtilis* 3Н.

Выращивание штаммов проводили методом периодического гомогенного глубинного культивирования в течение 24 часов в условиях аэрации и перемешивания при температуре 37 °С на полусинтетической питательной среде.

Для отделения метаболитов от клеточной массы (получение супернатанта) проводили центрифугирование при 8000 об/мин в течение 30 минут.

Для определения протеолитической активности использовали чашки Петри с агаризованным 2 % раствором казеина на 0,1 М трис–HCl буфере, в котором вырезали лунки диаметром 5 мм. Стерильным шприцом в опытные лунки вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Чашки термостатировали при температуре 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных зон гидролиза, образующихся в течение 3 минут после добавления в чашки 5 % раствора трихлоруксусной кислоты.

Определение продукции амилазы осуществляли в чашках Петри с картофельным агаром. Стерильным шприцом в опытные лунки диаметром 5 мм вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Далее чашки термостатировали при 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных светло–коричневых зон, образующихся в течение 5 минут после добавления в чашки 5 мл раствора Люголя.

Для определения продукции липазы в чашках Петри с агаризованной средой, содержащей твин-20, вырезали лунки диаметром 5 мм. Стерильным шприцом в опытные лунки вносили супернатант, в контрольные – физиологический раствор. Затем чашки термостатировали при 37 °С 24 часа. Результат оценивали по диаметру прозрачных зон гидролиза вокруг лунок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении протеолитических свойств штаммов выявлены различия в активности: зоны гидролиза у штаммов сенной палочки оказались в два раза больше, чем у *B. Pumillus*. (табл. 1). Амилолитические свойства также были более выраженными у штаммов *B. Subtilis* 1719 и 3Н, чем у *B. Pumillus* «Пашков». Активность сенной палочки в 2–2,5 раза оказалась выше (табл. 2). При исследовании липолитической активности диаметр зон гидролиза штаммов сенной палочки почти в 3 раза был больше, чем у *B. Pumillus* «Пашков» (табл. 3)

Таблица 1. Протеолитическая активность *Bacillus Pumillus* «Пашков»,
Bacillus subtilis 1719, *Bacillus subtilis* 3Н

Штаммы		Диаметр зоны гидролиза, мм
1.	<i>Bacillus Pumillus</i> «Пашков»	11,0 ± 0,8
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 1719	28,0 ± 1,1
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 3Н	25,0 ± 0,7

Таблица 2. Амилолитические свойства *Bacillus Pumillus* «Пашков»,
Bacillus subtilis 1719, *Bacillus subtilis* 3Н

Штаммы		Диаметр окрашенной зоны, мм
1.	<i>Bacillus Pumillus</i> «Пашков»	9,0 ± 0,3
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 1719	24,0 ± 0,6
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 3Н	23,0 ± 0,7

Таблица 3. Липолитическая активность *Bacillus Pumillus* «Пашков»,
Bacillus subtilis 1719, *Bacillus subtilis* 3Н.

Штаммы		Диаметр зоны гидролиза, мм
1.	<i>Bacillus Pumillus</i> «Пашков»	5,0 ± 0,3
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 1719	13,0 ± 0,7
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 3Н	14,0 ± 0,3

Полученные результаты свидетельствуют о высокой ферментативной активности штаммов *Bacillus subtilis* 1719, *Bacillus subtilis* 3Н., что согласуется с данными литературы [8]. При изучении антагонистических свойств нами получены данные, свидетельствующие о наиболее высокой активности именно у штамма *B. Pumillus* «Пашков» [12]. Исходя из этого, можно предположить, что противомикробные и ферментативные свойства бактерий рода *Bacillus* имеют штаммовые функциональные особенности, что необходимо учитывать при создании метабитических препаратов широкого спектра действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты расширяют представление о ферментативных свойствах бактерий рода *Bacillus* и позволяют установить, что штаммы *B. Subtilis*(3Н и 1719) обладают более высокими ферментативными свойствами, чем штамм *B. Pumillus* «Пашков».

ЛИТЕРАТУРА.

- Shenderov B.A., Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception // *Microb Ecol Health Dis.* 2013. Vol.24(1). Doi: 10.3402/mehd.v24i0.20399
- Волынец Г.А., Хавкин А.И. Современное представление о способах коррекции кишечной микробиоты при дисбиозе. // *Вопросы практической педиатрии.* -2018. – № 3. – С. 41–51
- Hong, H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2005. – Vol. 29, № 4. – P. 813–835.
- Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов // *Антибиотики и химиотерапия.* – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.
- Михайлова Н.А., Гринько О.М. Бактерии рода *Bacillus* – продуценты биологически активных веществ антимикробного действия. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010, № 3, С. 85–89
- Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics / Sumi C.D, Yang B.W., Yeo I.C., Nahm Y.T. // *Can. J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 61, № 2. – P. 93–103.
- Осипова, И.Г., Михайлова, Н.А., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Гайдеров, А.А. Споровые пробиотики // *Ж. микробиол.* – 2003. – № 3. – С. 113–119.
- Заборицкий Н.А. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus* // *Журнал научных статей здоровье и образование в 21 веке.* 2015. № 3.– С. 80–90
- Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*. // *Актуальная инфектология.* – 2016. – № 2. – С. 35–44
- Михайлова Н.А., Гатауллин А.Г. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 – продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилолитических и липолитических ферментов. // Патент РФ № 2298032. 2007
- Михайлова Н.А. и др. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата «Бактиспорин» // Патент РФ № 2067616. 1996
- Гринько О.М. и др. Штамм бактерий *Bacillus Pumilus* «Пашков» – продуцент биологически активных веществ, обладающих антагонистической активностью в отношении условно-патогенных, патогенных бактерий, дрожжевых грибов и вирусов. // Патент РФ № 2405821. 2010