

## ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ *BACILLUS* SP. 1.1 ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113

Досліджено пробіотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Встановлено, що штам *Bacillus* sp. 1.1 характеризувався високою або середньою антагоністичною активністю щодо музейних і актуальних тест-культур умовно-патогенних бактерій, а штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 проявляв низький або середній рівень активності. Обидва штами росли і синтезували каротиноїди при рН середовища 6,0, у присутності 0,4 % жовчі. Штами *Bacillus* sp. 1.1 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 є авірулентними, низькоадгезивними, а також чутливими до антимікробних препаратів, за виключенням колістину. Наведені результати свідчать про можливість створення на основі композиції штамів *Bacillus* sp. 1.1 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 пробіотичного препарату.

*Ключові слова:* бактерії роду *Bacillus*, каротинсинтезувальні штами, пробіотичні властивості.

На сьогодні на основі каротинсинтезувальних стрептоміцетів і дріжджеподібних грибів створено ряд ветеринарних препаратів, застосування яких дозволяє суттєво збільшити приріст біомаси та покращити фізіологічний стан тварин, запобігти хворобам, що пов'язані з порушенням обміну речовин. Проте жоден із відомих препаратів не поєднує у собі якості каротинвмісної добавки та пробіотичного препарату [3, 8]. Тому актуальним є дослідження пробіотичних властивостей каротинсинтезувальних штамів бактерій роду *Bacillus* [8]. Перевагами останніх у порівнянні з грибами і стрептоміцетами є виражена антагоністична активність щодо умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів, здатність до збереження біологічної активності в умовах шлунково-кишкового тракту, невибагливість до умов культивування, висока швидкість росту та накопичення біомаси. Крім того, бактерії роду *Bacillus* є переважно непатогенними для тварин, характеризуються високою ферментативною активністю, що позитивно впливає на процеси травлення, проявляють антиалергійний та детоксикауючий ефект. До того ж вони технологічні у виробництві, стабільні при зберіганні і екологічно безпечні [3–5].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити пробіотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 з колекції культур відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного (ІМВ) НАН України. Нами встановлено, що досліджені штами продукують пігменти каротиноїдної природи (дані щодо будови та природи пігментів не опубліковані).

Антагоністичну активність каротинсинтезувальних бактерій роду *Bacillus* досліджували щодо колекційних тест-культур умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ): *Salmonella thyphimurium* УКМ В-928, *S. enterica* УКМ В-920, *S. derby* ДІСК 1519, *Shigella flexneri* ДІСК 36/59, *Proteus vulgaris* УКМ В-905, *P. vulgaris* УКМ U-8, *Staphylococcus aureus* УКМ В-918, *Escherichia coli* УКМ В-906, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329, отриманих з колекції культур відділу антибіотиків ІМВ НАН України, а також щодо УПМ ізолятів *Salmonella* spp., *E. coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *S. aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* та *Streptococcus* spp., виділених з уражених органів тварин. Ізоляти патогенів було надано Центром ветеринарної діагностики ТОВ НВП «Біо-Тест-Лабораторія».

Антагоністичну активність досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* щодо один одного та УПМ вивчали методом відстроченого антагонізму. Рівень антагоністичної активності досліджуваних штамів оцінювали за зонами затримки росту тест-культур і виражали у мм. Штам вважали низько активним, якщо зона затримки росту тест-культур становила < 10 мм, середньо активним – від 10 до 14 мм, високо активним –  $\geq$  15 мм [12].

Здатність каротинсинтезувальних штамів бактерій роду *Bacillus* рости за різних значень рН

середовища, за наявності жовчі та глікохолевої кислоти вивчали в умовах глибинного культивування у рідкому живильному середовищі наступного складу (г/л):  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,29,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 9,60,  $\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,18, глюкоза – 10,00. Ріст штамів детектували шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини.

Адгезивні властивості штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 вивчали за методом В.І. Брилис і співавт. на еритроцитах людини І групи крові з визначенням середнього показника адгезії (СПА), коефіцієнту участі еритроцитів (КУЕ) та індекси адгезивності мікроорганізмів (ІАМ). Бактерії вважали неадгезивними при  $\text{ІАМ} \leq 1,75$ , низькоадгезивними – при  $\text{ІАМ}$  від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0, високоадгезивними –  $\geq 4,0$  [2].

Чутливість УПМ, штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 до антимікробних препаратів визначали диско-дифузійним методом [11] на агарі Мюллера-Хінтона (Himedia, Індія) з використанням комерційних дисків (Himedia, Індія) з спектиноміцином, гентаміцином, тілозином, амоксициліном, амоксиклавом, окситетрацикліном, доксицикліном, колістином, флорфеніколом, енрофлоксацином, флумеквіном та триметопримом. Контроль якості дисків з антибіотиками та агару Мюллера-Хінтона проводили з використанням еталонних штамів *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, які отримані з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАН України.

Патогенність штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 визначали з додержанням правил біоетики за допомогою біопроби, яку проводили на мишах лінії BALB/c вагою 14–16 г. Штам вважали токсичним, токсигенним, вірулентним у разі загибелі однієї чи більше тварин упродовж 3-х діб з моменту введення культуральної рідини, культуральної рідини прогрітої до 100 °С протягом 20 хв та бактеріальної суспензії відповідно. Для встановлення патологічних змін було проведено розтин тварин [1].

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ( $X_{\text{ср.}}$ ), середню квадратичну похибку ( $S_{x_{\text{ср.}}}$ ), при рівнях значимості 0,05 чи 0,01.

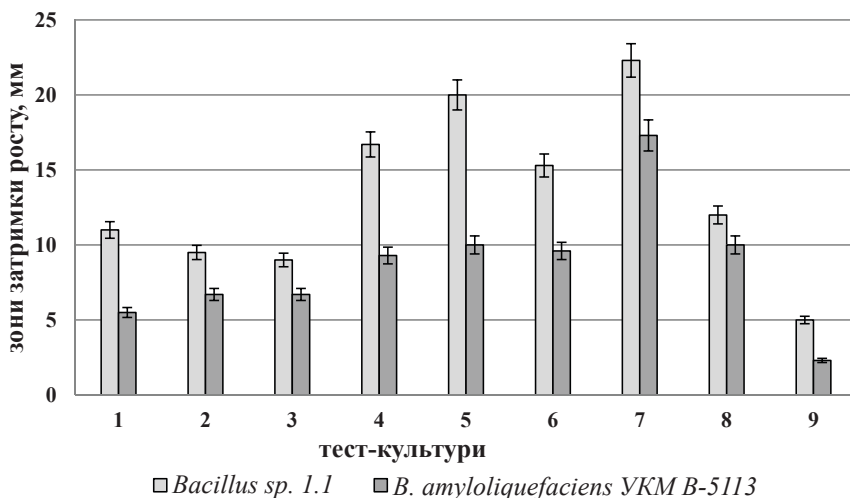
**Результати та їх обговорення.** Необхідними характеристиками пробіотичних штамів бактерій роду *Bacillus* є висока антагоністична активність щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, стійкість до низьких значень рН середовища та жовчі, низька адгезивна активність, відсутність генів стійкості до антибіотиків, а також авірулентність [7].

З огляду на це було встановлено, що *Bacillus* sp. 1.1 характеризувався високою антагоністичною активністю щодо *Shigella flexneri* ДІСК 36/59, *Proteus vulgaris* УКМ В-905, *P. vulgaris* УКМ U-8 та *Staphylococcus aureus* УКМ В-918 зони затримки росту яких становили 16,7, 20,0, 15,3 та 22,3 мм, відповідно (рис. 1). Середній рівень антагонізму штам проявляв щодо *Salmonella thyphimurium* УКМ В-928 та *Escherichia coli* УКМ В-906. Визначено, що *Bacillus* sp. 1.1 характеризувався низьким рівнем антагоністичної активності щодо *S. enterica* УКМ В-920, *S. derby* ДІСК 1519 та *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329.

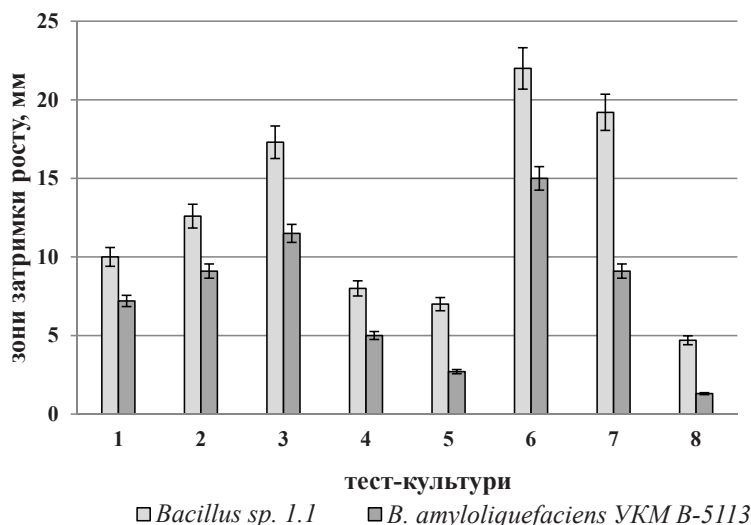
У той час *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 проявляв високу антагоністичну активність лише щодо штаму *S. aureus* УКМ В-918, зони затримки росту якого становили 17,3 мм. Ріст штамів *S. thyphimurium* УКМ В-928, *S. enterica* УКМ В-920, *S. derby* ДІСК 1519, *S. flexneri* ДІСК 36/59, *P. vulgaris* УКМ В-905, *P. vulgaris* УКМ U-8, *E. coli* УКМ В-906 та *P. aeruginosa* УКМ В-329 пригнічувався менше ніж на 10 мм (рис. 1).

Подібну закономірність виявлено щодо актуальних штамів УПМ, виділених з уражених органів тварин. Штам *Bacillus* sp. 1.1 проявляв високий рівень антагонізму щодо *Proteus* spp., *S. aureus*, *Streptococcus* spp., середній щодо *Salmonella* spp. та *E. coli*, низький щодо тест-культур *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* та *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 2).

На відміну від *Bacillus* sp. 1.1 штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 характеризувався високою антагоністичною активністю лише щодо ізолятів *Streptococcus* spp., принічуючи їх ріст на 15,0 мм. Середній рівень активності цей штам проявляв щодо ізолятів *Proteus* spp. Антагонізм щодо тест-культур *E. coli*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *E. cloacae* та *Pseudomonas* spp. виявився низьким (рис. 2).



**Рис. 1.** Антагоністична активність досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* щодо тест-культур: 1 – *S. thyphimurium* УКМ В-928, 2 – *S. enterica* УКМ В-920, 3 – *S. derby* ДІСК 1519, 4 – *S. flexneri* ДІСК 36/59, 5 – *P. vulgaris* УКМ В-905, 6 – *P. vulgaris* УКМ U-8, 7 – *S. aureus* УКМ В-918, 8 – *E. coli* УКМ В-906, 9 – *P. aeruginosa* УКМ В-329.



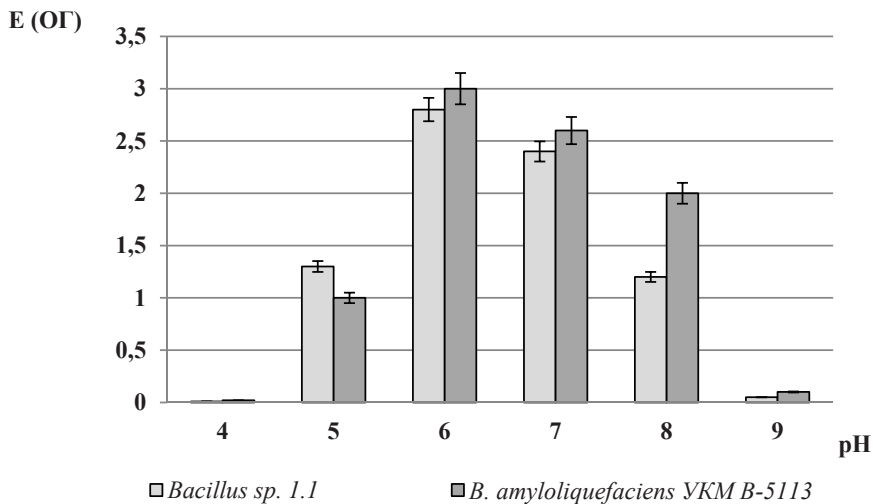
**Рис. 2.** Антагоністична активність досліджених штамів *Bacillus* spp. щодо умовно-патогенних бактерій, виділених з паталогічного матеріалу тварин: 1 – *Salmonella* spp., 2 – *E. coli*, 3 – *Proteus* spp., 4 – *K. pneumoniae*, 5 – *E. cloacae*, 6 – *Streptococcus* spp., 7 – *S. aureus*, 8 – *Pseudomonas* spp.

Слід зазначити, що більшість з досліджених актуальних ізолятів *E. coli* (*E. coli* O157:H17), *Salmonella* spp. та *Streptococcus* spp. були стійкими одночасно до триметоприму, колістину енрофлоксацину, тілозину, окситетрацикліну, доксицикліну та флорфеніколу. Тому антагоністичний ефект досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* щодо УПМ можна пояснити їх здатністю синтезувати не антибіотики, а алкалоїди (1-деоксисіриміцин), нуклеозиди, феназини, терпеноїди, бактеріоцини та дипіколінову кислоту [9, 10].

Отже, штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 характеризувався низькою антагоністичною активністю. Штам *Bacillus* sp. 1.1 проявляв середню та високу антагоністичну активність щодо грамнегативних і грампозитивних тест-культур, і за її рівнем не поступався деяким пробіотичним штамом бактерій родів *Bacillus*, складових біопрепаратів [12]. Нами встанов-

лено відсутність антагонізму між *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *Bacillus sp. 1.1*, тому доцільно припустити можливість їх сумісного використання, та створення бінарного біопрепарату, який буде поєднувати пробіотичні та провітамінні властивості.

Відомо, що пробіотичні бактерії повинні бути стійкими до низьких значень рН та концентрацій жовчі не менше 0,4 % [3]. Встановлено, що за рН середовища 4,0 ріст досліджуваних штамів бактерій роду *Bacillus* був відсутній (рис. 3). За рН середовища 5,0 спостерігали ріст та незначну пігментацію штамів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, оптична густина (ОГ) культуральної рідини складала 1,0 та 1,3 одиниць, а за значення рН 6,0 – 2,8 та 3,0 одиниць, відповідно. У той час за умов залуження середовища виявлено поступове зменшення кількості бактеріальних клітин, а за рН 9,0 ріст досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* був відсутній (рис. 3). Отже, оптимальним значенням для росту і продукування пігментів штамми *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 є рН 6,0.



**Рис. 3. Ріст досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* за різних значень рН середовища**

Крім того, за наявності в середовищі культивування 0,4 % жовчі характер пігментоутворення не змінювався, а оптична густина культуральної рідини штамів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 становила 1,0 та 1,2 одиниць, що відповідно складало 67 % і 80 % від контролю, відповідно. За умов подальшого збільшення концентрації жовчі у середовищі, ріст досліджуваних каротинсинтезувальних штамів був відсутнім. До того ж, при 4,0 % вмісті глікохолевої кислоти (компонент жовчі) в середовищі, ріст та пігментоутворення досліджуваних штамів не відрізнялися від контролю.

Таким чином, завдяки здатності штамів *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 рости за низьких значень рН та у присутності жовчі і глікохолевої кислоти, вони можливо будуть виживати і синтезувати каротиноїдні пігменти в умовах шлунково-кишкового тракту.

Крім того, обидва досліджуваних штами мали низький рівень адгезивної активності, про що свідчить їх індекс адгезивності, який для *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 становив  $2,0 \pm 0,06$  та  $2,18 \pm 0,15$ , відповідно. Цей факт підтверджує можливість використання останніх у складі біопрепарату.

З літературних даних відомо, що пробіотичні штами бактерій роду *Bacillus* повинні бути чутливими до антимікробних препаратів, що унеможливує передачу генів стійкості до антибіотиків представникам кишкової мікрофлори [6, 7]. Встановлено, що штами *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були помірно стійкими до спектиноміцину та окситетрацикліну, чутливими до гентаміцину, амоксициліну, амоксилаву, доксицикліну, тілозину, флорфеніколу, енофлораксацину, флумеквіну та триметоприму. Відмічено резистентність лише до поліміксину Е (колістину), що можна пояснити природною стійкістю бактерій роду *Bacillus* до цього антибіотика [7].

Отже, штами *Bacillus sp. 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були чутливими до

аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів, феніколоів та хіміотерапевтичних препаратів (хінолінів, діамінопіримідинів), які широко використовуються для лікування бактеріальних інфекцій у тваринництві.

В результаті дослідження патогенності штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 встановлено, що внутрішньочеревинне введення мишам  $1 \times 10^{10}$  КУО досліджуваних штамів не призводило до загибелі тварин, що свідчить про їх авірулентність. Штами були також нетоксичними та нетоксигенними, оскільки упродовж 3-х діб з моменту введення їх культуральної рідини, зокрема прогрітої, не загинуло жодної тварини. Слід відзначити, що при розтині тварин не було виявлено патоанатомічних змін у серці, печінці, нирках, кишечнику, легенях та шлунку мишей. Проте, за результатами розтину у мишей, яким вводили суспензії досліджуваних штамів бацил, був виявлений незначний набряк селезінки (реактивна селезінка), що зумовлено активацією білої пульпи внаслідок антигенного навантаження.

Отже, нами встановлено, що штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 не проявляє антагоністичної активності щодо широкого спектру УПМ. Однак, завдяки синтезу каротиноїдних пігментів, здатності рости за низьких значень рН та у присутності жовчі, низькій адгезивній активності, безпечності для тварин, відсутності антибіотикорезистентності, він може використовуватися як харчова добавка. Штам *Bacillus* sp. 1.1 за своїми біологічними властивостями повністю відповідає вимогам до пробіотичних культур. Сумісне використання *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *Bacillus* sp. 1.1 дасть можливість створити композицію з властивостями харчової добавки та пробіотичного препарату.

**Л.В. Авдєєва, О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

### **ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ШТАММОВ *BACILLUS* SP. 1.1 ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113**

#### **Резюме**

Исследованы пробиотические свойства каротинсинтезирующих штаммов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Установлено, что *Bacillus* sp. 1.1 характеризовался высокой либо средней антагонистической активностью в отношении музейных и актуальных тест-культур условнопатогенных бактерий, а штам *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 проявлял низкий либо средний уровень активности. Оба штамма росли и продуцировали пигменты при рН среды 6,0 в присутствии 0,4 % желчи. Штаммы *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 оказались авирулентными, низкоадгезивными, а также чувствительными к антимикробным препаратам, за исключением колистина. Представленные результаты свидетельствуют о возможности создания на основе композиции штаммов *Bacillus* sp. 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 пробиотического препарата.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Bacillus*, каротинсинтезирующие штаммы, пробиотические свойства.

**Avdeeva L.V., Nechipurenko O.O., Kharhota M.A.**

*Zabolotnogo Institute of microbiology and virology NAS of Ukraine, Kyiv*

### **PROBIOTIC FEATURES OF CAROTENE PRODUCING STRAINS *BACILLUS* SP. 1.1 AND *B. AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113**

#### **Summary**

Researched probiotic properties of carotinproducing strains *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113. It was established that *Bacillus* sp. 1.1 characterized by high and middle antagonistic activity against museums and actual test cultures and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 shown middle and low activity. They grew up and formed a pigment at pH 6.0 in the presence of 0,4% bile. *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 were avirulent, had low antagonistic activity and characterized by susceptibility to antimicrobial

agents, excluding colistin. The results suggested the possibility to create based on *Bacillus* sp. 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 probiotic preparation.

**К е у w o r d s:** bacteria of *Bacillus* genus, carotene producing strains, probiotic properties.

1. Антонова Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции. – М.: Агропромиздат, 1986. – 352 с.
2. Брилис В.И., Ленцер Х.П., Ленцер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 210–212.
3. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2. – С. 32–33.
4. Скрыпник И.Н., Маслова А.С. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 3. – С. 81–91.
5. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–193.
6. Ashraf R., Shah N. P. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products // International Food Research Journal. – 2011. – Vol. 3. – P. 837–853.
7. Cutting S. M. Bacillus probiotics // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 28 – P. 214–220.
8. Duc L.H., Fraser P.D., Tam N.K. Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* sporeformers // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – № 255. – P. 215–224.
9. Hwang K.Y, Cho J.H., Lee J.Y. The benefits of using bacillus as a probiotic // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–4362.
10. Lee J., Park I.; Cho Y. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2012. – Vol. 25. – P. 577–585.
11. May D. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test // Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2010. – Vol. 30, №1 – P. 1–153.
12. Moore T., Globa L., Barbaree J. Antagonistic activity of bacillus bacteria against food-borne pathogens // Journal of Prob. Health. – 2013. – Vol. 1. – P. 1–6.

Отримано 10.03.2014