

УДК: 619:636.52/58.087.8
© 2015

И.А. БИБЕН,
кандидат ветеринарных наук

Днепропетровский государственный
аграрно-экономический университет,
Украина
E-mail: bibenvet@ukr.net

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ,
БИОХИМИЧЕСКИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР
BAC. SUBTILIS
ШТАММЫ VI-9 И VI-12

Вивчені базисні характеристики пробіотичних культур *Bac. subtilis* штамів VI-9 и VI-12, ізольованих з фекальних мас від здорових, угодованих поросят 2-місячного віку. Штами були відібрані на підставі їх апатогенності, бо вони не проявляли гемолітичної і лецитіназної активності. Бацили володіли типовими для виду морфо-тінкторіальними, культуральними і біохімічними властивостями, на підставі чого, за даними краткого визначника бактерій Берджи, були ідентифіковані як *Bacillus subtilis*. Штами проявили виражену антагоністичну активність відносно широкого кола патогенних і умовно-патогенних мікробів, що є важливим критерієм для їх використання як пробіотичних культур, тобто транзиторної ідгенної мікрофлори.

Ключові слова: *Bac. subtilis*, пробіотичні культури, антагоністична активність, транзиторна мікрофлора, біологічні властивості, стійкість до антибіотиків.

Актуальность проблемы. Пробиотические препараты все более широко используются в гуманной и ветеринарной медицине для коррекции микробиологических нарушений при острых и хронических заболеваниях, дисфункциях кишечника, обменных нарушениях, после антибактериальной и гормональной терапии, при снижении иммунобиологической реактивности и иммунодефицитных состояниях молодняка [1, 6, 7, 15].

Пробиотики – это биопрепараты, изготовленные из живых антагонистически активных бактерий, представителей нормальной *s.* резидентной микрофлоры – лактобактерий, бифидобактерий, кишечной палочки, аэрококков [5, 9, 11].

По совокупности физиолого-биохимических свойств и факторов биологической активности перспективными для создания пробиотиков из неиндигенной микрофлоры оказались бациллы, главным образом относящиеся к *Bac. subtilis*, *Bac. cereus*, *Bac. megaterium*, *Bac. licheniformis*, *Bac. brevis*, *Bac. pumilus*, *Bac. polymyxa*, *Bac. coagulans*, *Bac. laterosporus*. Эти виды, стабильно выде-

ляющиеся из разнообразных биотопов, в том числе из организма и тканей теплокровных животных, насекомых и растений, не вызывают в объектах персистенции патологических изменений [4, 10, 12, 14].

Важное научно-практическое значение имеют исследования, посвященные использованию живых микробных культур рода *Bacillus* для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний у молодняка сельскохозяйственных животных. Выявлена способность бацилл повышать иммунитет к инфекционным заболеваниям, так как они индуцируют синтез эндогенного интерферона при пероральном применении. Продукты биосинтеза микробных культур рода *Bacillus* являются нативными стимуляторами роста молодняка, гармонизируют микробный пейзаж кишечника, увеличивают количество бифидобактерий, лактобацилл при одновременном снижении энтеробактерий, клостридий [2, 3, 8, 13].

Особый интерес представляет вопрос о биологических свойствах спорозоных бактерий, изолируемых из объектов живой и

неживой природы в связи с изучением механизма их воздействия на макроорганизм. Это важно для выявления новых резервов при создании эффективных лечебно-профилактических препаратов, поскольку пробиотические бациллы проявляют антагонистические свойства по отношению к различным бактериям и грибам, при этом самую высокую биологическую активность зафиксировали у пробиотических культур *Bacillus subtilis* [9, 11, 15].

Цель работы: изучить морфо-тинкториальные, культуральные, биохимические свойства, антибиотикоустойчивость и антагонистическую активность у пробиотических культур *Bacillus subtilis* штаммов VI-9 и VI-12.

Материалы и методы. Индикацию и идентификацию культур спороносных бактерий проводили путем высева исследуемого материала в чашки Петри с плотной питательной средой, посева помещали в термостат при 37–38 °С на 18–24 ч, просматривали посева, готовили мазки и окрашивали их по Граму, отвивали культуры спороносных бактерий [7].

В качестве питательных сред использовали МПА, МПБ, модифицированную среду Гаузе № 2, МПА с добавлением 7%-ной NaCl, 5%-ной кровяной МПА для определения гемолитических свойств, яичный бульон для тестирования лецитиназной активности, казеиновый и крахмальный агары для определения ферментативных свойств.

Биохимические свойства бацилл определяли на средах Олькеницкого с индикатором бромтимоловым синим и карбогидратами – глюкозой, ксилозой, маннитом, сахарозой, мальтозой, салицином и эскулином.

Утилизацию цитрата и пропионата тестировали на среде Козера, способность восстанавливать нитраты – в бульоне с нитратами, определение в среде ацетоина (реакция Фогеса-Проскауэра) проводили на среде Кларка. Способность продуцировать сероводород изучали на среде Киглера; каталазную активность выявляли в реакции с 3%-ного H₂O₂; способность культур вырабатывать индол – на питательном бульоне с индикатором; фермент уреазу – на среде с мочевиной (по Кристенсену).

Антагонистическую активность тестировали методом отсроченного антагонизма по отношению к патогенным и условно-патогенным бактериям [3].

Статистическую обработку цифрового материала проводили по общепринятым методикам.

Результаты исследований и их обсуждение. Биологические свойства пробиотических культур *Bac. subtilis* исследовали в НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского ГАЭУ и бактериологическом отделе Днепропетровской ГЛВМ.

Индикацию и идентификацию 12 полевых культур *Bac. subtilis* проводили согласно общепринятым методикам и по ключу Берджи (1997).

Культуральные характеристики сенных бацилл регистрировали на элективной плотной среде Гаузе № 2 в косопроходящем свете, обнаружив при этом три варианта структурирования колоний:

- круглые, крупные, с ровными краями, выпуклые, куполообразные, матовые, зернистые, шероховатые колонии, а также зернистые колонии с выступающим центром;
- амебовидной формы с волнистыми краями, морщинистые, плоские, шероховатые колонии;
- круглые, выпуклые, куполообразные, шероховатые колонии с волнистыми краями.

Все три морфологических варианта колоний были светло-серого цвета и синтезировали пигмент от бежевого до розового оттенков.

При светлопольной микроскопии в иммерсионной системе препаратов-мазков, окрашенных по Граму, обнаружили Г+ стрептобациллы и одиночные клетки размером 2,8–3,2×0,6–0,8 мкм, с центральным и парацентральным расположением светопреломляющих эндоспор.

Из 12 изолированных культур только две не обладали факторами патогенности (гемолитической и лецитиназной активностью), поэтому их выбрали для дальнейших исследований и зарегистрировали как штаммы VI-9 и VI-12. Биохимические свойства непатогенных культур представлены в табл. 1.

Культуры сенных бацилл характеризовались подвижностью, способностью утилизировать глюкозу, ксилозу, маннит, сахарозу, мальтозу, гидролизовать эскулин и крахмал, не утилизируют лактозу и салицин, не образовывали газ при расщеплении глюкозы. Штаммы обладали способностью к росту на средах в присутствии 7%-ной NaCl и цитрата, восстанавливали нитраты, не продуцировали индол, сероводород и фермент уреазу, не утилизируют пропионат, гидролизировали крахмал и казеин, а также разжижали 10 % желатина. У штаммов не выявлено патогенных свойств, о чем свидетельствует отсутствие гемолитической и лецитиназной активности.

Антагонистические потенции культур сенных бацилл в опытах *in vitro* оценивали с помощью метода отстроченного антагонизма, используя тест-культуры из коллекции ГНКИБШМ (Киев), любезно предоставленные профессором В.А. Ушкаловым. Полученные экспериментальные данные, характеризующие антимикробную способность пробиотических культур сенных бацилл, изложены в табл. 2. Результаты исследований дают возможность утверждать, что пробиотические культуры *Bacillus subtilis* штаммы VI-9 и VI-12 обладают высоким уровнем антагонистической активности в отношении широкого круга патогенных и условно-пато-

1. Ферментативные свойства пробиотических культур *Bac. subtilis*

Тесты	Штамм VI-9	Штамм VI-12
Глюкоза	+	+
Ксилоза	+	+
Маннит	+	+
Лактоза	-	-
Сахароза	+	+
Мальтоза	+	+
Салицин	-	-
Эскулин	+	+
Фермент уреазы (мочевина по Кристенсену)	-	-
Редукция нитратов	+	+
Продукция сероводорода (на среде Клиглера)	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра (среда Кларка)	+	+
Рост на среде с 7%-ной NaCl	+	+
Утилизация цитрата (среда Козера)	+	+
Каталазная активность	+	+
Индол	-	-
10%-ный желатин	+	+
Гемолитические свойства	-	-
Лецитиназная активность	-	-
Анаэробный рост	-	-
Подвижность	+	+
Гидролиз крахмала	++	+++
Гидролиз казеина	+	+

2. Антагонистическая активность пробиотических культур *Bac. subtilis*

Штаммы антагонисты	Задержка роста тест-культуры, мм ($M \pm m$)	
	штамм VI-9	штамм VI-12
<i>Staphylococcus aureus</i> 209	25±3	26±4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22±3	24±3
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	25±4	26±4
<i>Salmonella typhimurium</i>	13±2	14±3
<i>Salmonella choleraesuis</i>	15±2	16±3
<i>Salmonella enteritidis</i>	14±3	17±3
<i>Salmonella gallinarum-pullorum</i>	16±4	18±3
<i>Shigella sonnei</i>	12±1	12±2
<i>Esherichia coli</i>	28±4	26±3
<i>Proteus vulgaris</i>	28±3	30±4
<i>Proteus mirabilis</i>	19±4	22±2
<i>Pasteurella multocida subsp. gallicida</i>	18±3	20±3
<i>Candida albicans</i>	26±3	28±4

генных микроорганизмов, различия между штаммами количественно незначительны и статистически недостоверны, что убеждает в их биологической равноценности при использовании в качестве основы при композиции комплексного пробиотического препарата.

Анализ современных литературных данных по проблеме спорозоносных пробиотиков и наши собственные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что они являются эффективными биопрепаратами для коррекции дисбиотических и иммунодефицитных состояний, а также неспецифической профилактики и лечения инфекционной патологии, индуцированной патогенной и условно-патогенной микрофлорой. Многообразие и особенности биологически активных субстанций, продуцируемых бактериями, имеют штаммовые различия, раскрывают механизмы и направленность фармакодинамики биопрепаратов на основе споробразующих бактерий индигенной транзитной микрофлоры при коррекции различных патологических состояний, а также определяют использование их для получения продуктов микробного синтеза на предпри-

ятиях биологической промышленности.

Несмотря на широкий ассортимент препаратов-пробиотиков, в гуманной и ветеринарной медицине, наблюдается устойчивая тенденция к повышению потребности в пробиотических препаратах для коррекции увеличивающегося количества дисбиотических и иммунодефицитных состояний, замены кормовых антибиотиков кормовыми пробиотиками. Постоянное увеличение и качественная модификация инфекционной патологии банального происхождения факторного типа с эстафетной и безэстафетной передачей возбудителя связана как с формированием новых и генетически измененных популяций микробиоценозов, так и с адаптацией циркулирующих условно-патогенных микробов к антимикробным средствам и штаммам-антагонистам, используемыми длительное время при нарушении зооигиенических норм содержания и эпизоотических закономерностей инфекционного генеза и развития инфекционной патологии. Поэтому поиск и выделение перспективных штаммов спорозоносных бактерий с пробиотическими потенциальными считаем важной задачей биотехнологических исследований.

Изучаемые полевые варианты пробиотических культур сенных бацилл являются перспективными культурами для их дальнейшего изучения и селективного отбора биологически

ценных штаммов в направлении оптимизации пробиотической активности в процессе детерминированного мутагенеза и фенотипической адаптационной изменчивости.

Выводы

1. Изученные полевые пробиотические культуры сенных бацилл обладают типичными для вида морфо-тинкториальными, культуральными и биохимическими характеристиками, на основании чего, согласно определителю Берджи, были идентифицированы как *Bacillus subtilis* и зарегистрированы как штаммы VI-9 и VI-12.

2. Изолированные от здоровых животных

культуры *Bacillus subtilis* штаммы VI-9 и VI-12 являются сапрофитами из-за отсутствия факторов патогенности (гемолизина и лецитиназа) и обладают пробиотическими потенциями, проявляя выраженный противомикробный антагонизм против широкого круга патогенных и условно-патогенных возбудителей, что дает возможность использовать их как транзиторную индигенную микрофлору.

Библиография

1. Вплив нового вітчизняного пробіотика “Біонорм П” на ефективність вакцинації проти вірусних хвороб бройлерів / І.К. Авдос’єва, В.В. Регенчук, О.Б. Басараб [та ін.] // Ветеринарія. – 2011. – № 10(107). – С. 12–14.

2. Бессарабов Е. Опыт применения микродисперсной формы пробиотика “Лактобифадол” курам / Е. Бессарабов // VI Международный ветеринарный конгресс по птицеводству (26–29 апреля 2010 г.). – М., 2010. – С. 158–163.

3. Антагонистическая активность свежесделанных штаммов бактерий рода *Bacillus* / Л.П. Блинкова, С.А. Семенова, Л.Г. Бутова [и др.] // ЖМЭИ. – 1994. – № 5. – С. 71–72.

4. Осадчая А.И. Влияние кислотности среды и температуры на рост и экскрецию полисахаридов *Bacillus subtilis* при глубинном культивировании / А.И. Осадчая, В.А. Кудрявцев, Л.А. Сафонов // Микробиол. журн. – 1998. – Т. 60, № 4. – С. 25–32.

5. Споровые пробиотики / И.Г. Осадчая, Н.А. Михайлова, И.Г. Сорокулова [и др.] // Микробиол. журн. – 2003. – № 3. – С. 113–119.

6. Сорокулова И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых биопрепаратов / И.Б. Сорокулова // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.

7. Смирнов В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В.В. Смирнов // К., 1983. – 49 с.

8. Смирнов В.В. Создание и практическое применение математической модели антагони-

стического действия бацилл при конструировании пробиотиков / В.В. Смирнов, О.Н. Рева, В.А. Вьюницкая // Микробиол. журн. – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 661–667.

9. Топчий М.П. Применение препаратов из живых культур сенной палочки при дисбактериозах у телят: автореф. дис. на соиск. ученой степени канд. биол. наук / М.П. Топчий. – Минск, 1997. – 21 с.

10. Тришина Н.В. Связь между развитием дисбактериоза кишечника и состоянием антиэндотоксинового иммунитета: автореф. дис. на соиск. ученой степени канд. мед. наук / Н.В. Тришина. – М., 2003. – 24 с.

11. Bansal S. Probiotics in health and diseases / S. Bansal // J. Assoc. physicians. – 2001. – № 7. – P. 734–741.

12. Buchell M.E. A physiological model for erythromycin production in bath and cyclyc fed bath culture / M.E. Buchell, J. Smith, H.C. Lynch // Microbiology. – 1997. – Vol. 143, № 2. – P. 475–480.

13. Factorial correspondence analysis of fear-related behavior traits in Japanese quail / S. Mignon-Grasteau, O. Roussot, C. Delaby [et al.] // Behaviour Processes. – 61(1–2). – 2003. – P. 69–75.

14. Kerti A. Content of retinol and retinyl esters in blood plasma, liver, kidney and reproductive organs of Japanese quails / A. Kerti, I. Buchholz, F.J. Schweigert // Acta Vet. Hung. – 50(4). – 2002. – P. 435–443.

15. Manual of Clinical Microbiology / P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller [et al.] // 7th Edition, Washington D.C., ASM Press. – 1999. – 146 p.

Рецензенты – доктора ветеринарных наук, профессора М.П. Високос, П.М. Скляров