Биология

УДК 619:616.98:632.2:612.117:615.37

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ

*Борисовец Д.С., *Журавлева Е.С., **Красочко П.А., **Яромчик Я.П., *Морозов А.М., *Курбат И.А. *РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

В статье приведены результаты определения антимикробных и противовирусных свойств штаммов бактерий рода Bacillus, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов, с дальнейшим направлением их использования в качестве продуцентов ряда пробиотических культур. Изучены пробиотические свойства, антимикробная и противовирусная активность, безвредность и токсичность штаммов рода Bacillus. Для дальнейшей работы при конструировании ветеринарных препаратов отобрано 3 изолята: В. licheniformis, В. тедаterium, В. subtilis, которые являлись безвредными и нетоксичными для лабораторных животных, обладали высокой амило- и целлюлолитической активностью, а также широким спектром антибактериальной и противовирусной активности. Ключевые слова: водоемы, бактерии, изоляты, пробиотики.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF STAINS OF BACTERIAS OF THE GENUS BACILLUS ISOLATED FROM THE BOTTOM SEDIMENTS OF PONDS

*Borisovets D.S., *Zhuravleva E.S., **Krasochko P.A., **Yaromchik Y.P., *Morozov A.M., *Kurbat I.A.

*Institute of experimental veterinary medicine named S.N. Vyshelesski, Minsk, Republic of Belarus

**Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

The article presents the results of determining the antimicrobial and antiviral properties of bacterial strains of the genus Bacillus, isolated from the bottom sediments of ponds, with a further direction of their use as producers of probiotic cultures. The probiotic properties, antimicrobial and antiviral activity, harmlessness and toxicity of strains of the genus Bacillus were studied. For further work in the design of veterinary preparations, 3 isolates were selected: B. licheniformis, B. megaterium, B. subtilis, which were harmless and non-toxic for laboratory animals, had high amylo- and cellulolytic activity, as well as a wide spectrum of antibacterial and antiviral activity. **Keywords**: ponds, bacterias, isolates, probiotics.

Введение. Высокая концентрация поголовья скота в условиях крупных животноводческих комплексов приводит к возникновению и распространению вирусно-бактериальных энтеритов у молодняка крупного рогатого скота [7, 9].

В настоящее время широко используется стратегия селекционной работы с микроорганизмами, которая заключается в поиске природных форм, обладающих антимикробными и противовирусными свойствами [5, 6, 8].

В схемы лечения и профилактики инфекционных болезней животных все чаще включают бактериофаги и культуры бактерий, подавляющие патогенную микрофлору за счет выработки антибиотикоподобных веществ [1, 4].

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе биопрепаратов, отнесенных к поколению так называемых самоэлиминирующихся антагонистов. Создано более полусотни биологических препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спороформирующих бактерий. Штаммы бацилл для ветеринарного применения чаще всего включают *B.subtilis, B. licheniformis, B. coagulans, B. clausii, B. polyfermentans u B. cereus* [1, 2, 5].

В связи с высоким уровнем антибиотикорезистентности и широким распространением факторных болезней молодняка сельскохозяйственных животных инфекционной этиологии, разработка биологических препаратов на основе форм микроорганизмов, обладающих выраженными антибактериальным и противовирусным свойствами, является актуальным научным направлением и требует изыскания штаммов бактерий с заданными свойствами.

Цель работы – определение пробиотических свойств, антимикробной, противовирусной и ферментативной активности выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus*, а также возможности их применения для конструирования ветеринарных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики инфекционных болезней молодняка крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Экспериментальная работа проводилась в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», виварии института, научной лаборатории кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины».

В качестве объекта исследования были использованы образцы донных отложений из 11 пресноводных водоемов, находящихся в Гомельской, Минской, Брестской и Витебской областях Республики Беларусь.

Предметом исследований являлся видовой состав изолятов бактерий рода Bacillus.

При проведении отбора образцов донных отложений пресноводных водоемов и выделении из них штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* в качестве селективной среды использовалась среда Spizizen's minimal salts (SMS) [10]. Выделение и идентификацию бактериальных изолятов проводили согласно схеме выделения Желдаковой Р.А. [2]. Идентификацию выделенных изолятов проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе «VITEK 2 compact».

При определении безвредности выделенных микроорганизмов готовили 24-часовые бульонные культуры 12-ти изолятов бактерий рода *Bacillus*.

Выращенные культуры вводили перорально белым мышам (по десять голов на каждый образец) по 1,0 см³ (однократно). Наблюдение за животными продолжали в течение 10 суток. Образец считался безвредным, если в течение всего срока наблюдения отсутствовала гибель подопытных животных. При гибели хотя бы одного животного проверку проводили на удвоенном количестве мышей. Если при повторном контроле ни одно из животных не погибало, испытуемый образец считали безвредным.

Опыт по определению возможной острой токсичности выделенных штаммов и определения оптимальных доз для применения проведен в два этапа: предварительный и основной. Испытуемые образцы 24-часовой бульонной культуры каждого бактериального штамма, безвредного для лабораторных животных вводили белым мышам с помощью иглы-зонда с наплавленной оливой, из расчета не более 1,0 см³ на однократное введение.

На предварительном этапе исследования животным вводили нативный образец 24часовой культуры отобранного изолята бактерий и по два десятикратных разведения. На каждую дозу было взято по 3 мыши.

На основном этапе исследования использовались нативные образцы каждого штамма и по 5 их двукратных разведений от 1:2 до 1:32. На каждую дозу брали по 6 мышей. За лабораторными животными устанавливали наблюдение в течение 14 дней.

Также при изучении биологических свойств изолятов бактерий нетоксичных штаммов рода *Bacillus*, нами были изучены их пробиотические свойства, наличие у них сахаролитических и целлюлолитических ферментов, а также определение их антимикробных и противовирусных свойств.

Для определения акктивности амилазы готовили субстратную смесь следующего состава: 0,5 мл 2% раствора крахмала и 0,5 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0).

Для определения активности целлюлазы готовили субстратную смесь: 0,5 мл 2% раствора КМЦ и 0,5 мл 0,2 М фосфатного буфера (рН 7,0).

Концентрацию образовавшихся восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному с использованием 0,1% раствора глюкозы (100–800 мкг/мл).

При определении антибактериальной активности использовали следующие тесткультуры: Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Salmonella dublin, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae. В качестве питательной среды применили сердечно-мозговой агар с концентрацией агара 1,2 и 2% (рН 6,8-7,0).

Пробойником из инокулированных тест-культурами бактерий агаровых пластинок вырезали диски диаметром 10 мм, получая на каждой чашке Петри по 2 симметрично расположенных отверстия, в которые вносили по 0,2 мл 24-часовой бульонной культуры каждого бактериального штамма. После внесения жидкости в лунки чашки Петри осторожно помещали в холодильник при +10°С для диффузии и спустя 2-3 ч переносили в термостат с температурой (37 □1)°С. Через 24 ч измеряли диаметр образовавшихся вокруг лунок зон ингибирования роста тесткультур.

За окончательный результат испытания принимали среднее арифметическое значение величины диаметра зоны ингибирования роста тест-объекта, рассчитанное по данным, полученным на пяти чашках Петри для каждого тест-объекта отдельно.

При определении противовирусной активности в качестве тест-вируса использовали вирус диареи крупного рогатого скота — штамм «КМИЭВ-V120» из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для приготовления монослоя клеток в плоскодонных 96-луночных планшетах использовали суспензию культур клеток линии MDBK в концентрации 300 тыс. клеток/мл. В

лунки планшетов вносили по 100 мкл поддерживающей питательной среды, а затем в те же лунки - суспензию клеток линии MDBK (по 100 мкл в каждую). Планшеты с культурой клеток инкубировали в течение 48-72 ч в термостате при температуре плюс $(37\pm0,5)^{\circ}$ C в атмосфере с объемной долей углекислого газа $(4,0\pm0,5)$ % и относительной влажностью (75 ± 5) % до формирования в лунках планшет сплошного монослоя, включающего только типичные клетки.

Для проведения исследований готовили по восемь 2-кратных разведений культуральной жидкости (КЖ) каждого из отобранных штаммов *B. licheniformis 2-1(2)-3, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1, B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2).*

Отбирали по 250 мкл каждого разведения КЖ штаммов в 24-луночные круглодонные планшеты, в которые вносили по 250 мкл вируса (рабочая доза — 100 ТЦД $_{50}$ /0,1 мл), тщательно перемешивали и помещали на 1 час в термостат при температуре плюс $(37\pm0,5)^{\circ}$ С для контакта вируса с КЖ.

Из 96-луночных планшет с хорошо развитым монослоем встряхиванием удаляли питательную среду и вносили в них приготовленные разведения КЖ с вирусом в объеме по 200 мкл на каждую лунку и затем по 100 мкл поддерживающей питательной среды. Для каждого разведения использовали по 2 лунки.

Планшеты инкубировали в течение 96 ч в термостате при температуре плюс (37±0,5)°С в атмосфере с объемной долей углекислого газа (4,0±0,5)%.

Для контроля клеточного монослоя в лунки вносили по 200 мкл поддерживающей питательной среды. В лунки, предназначенные для контроля рабочей дозы вируса, вносили по 100 мкл поддерживающей питательной среды.

Для контроля рабочей дозы вируса вносили разведения вируса с активностью 100 ТЦД $_{50}$, 10 ТЦД $_{50}$, 1 ТЦД $_{50}$ и 0,1 ТЦД $_{50}$ в объеме 100 мкл, используя по 4 лунки на каждое разведение.

Через 72 ч после начала инкубации проводили учет результатов под микроскопом при увеличении в 100 раз. За титр исследуемого образца КЖ принимали величину, обратную ее разведению, при котором 50% клеток в культуре оказались защищены от цитопатического действия (ЦПД) вируса.

При изучении пробиотических свойств штаммов рода *Bacillus* были определены их сахаролитическая и целлюлолитическая ферментативная активность, а также наличие их антимикробных и противовирусных свойств.

Результаты исследований. При проведении отбора и анализа состава образцов донных отложений пресноводных водоемов различных областей Республики Беларусь и выделении из них штаммов микроорганизмов рода *Bacillus* отобрано 11 образцов тонко- и грубодетритных донных отложений водоемов Гомельской, Брестской, Витебской и Минской областей Республики Беларусь, из которых выделено 15 природных изолятов бактерий.

Из 15 выделенных изолятов идентифицировано: 12 штаммов рода *Bacillus*, при этом степень идентификации составила от 85 до 99% (*B. subtilis* – 4 изолята, *B. licheniformis* – 3, *B. cereus* – 2, *Bacillus megaterium* – 2, *Lysinibacillus sphaericus* – 1). В связи с неудовлетворительным ростом изолята *Lysinibacillus sphaericus* на селективной среде SMS в дальнейших экспериментах участвовали 11 из 12 выделенных штаммов.

Результаты определения безвредности бульонных культур выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели безвредности изолятов бактерий рода *Bacillus* на белых мышах

Nº	Штамм	Количество	Количество
п/п		выживших животных	погибших животных
1	B. subtilis № 2-1(2)1	6	4
2	B. subtilis № 2-1(2)2	5	5
3	B. licheniformis № 2-1(2)-2	10	0
4	B. cereus № 2-1(2)-4	3	7
5	B. cereus № 3-1(1)-1-1	0	10
6	B. megaterium № 3-1(1)-2 2-1	10	0
7	B. subtilis № 3-1(1)-2 2-2	8	2
8	B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2)	10	0
9	B. licheniformis № 1-1-2(2)	6	4
10	В. megaterium (изолят 2)	2	8
11	В. licheniformis (изолят 5)	9	1

Исходя из полученных результатов исследований по определению безвредности выделенных изолятов штаммов бактерий, представленных в таблице 1, штаммы B. subtilis № 2-1(2)1, B. subtilis № 2-1(2)2, B. cereus № 2-1(2)-4, B. cereus № 3-1(1)-1-1, B. subtilis 3-1(1)-2-2, B. licheniformis 1-1-2(2), B. megaterium 2, B. megaterium 5, при введении которых наблюдалась гибель лабораторных животных, были удалены из дальнейшей работы.

Штаммы *B. licheniformis* 2-1(2)-2, *B. megaterium* 3-1(1)-2 2-1, *B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) признаны безвредными для белых мышей.

При определении острой токсичности изолятов бактерий рода *Bacillus*.

Таблица 2 – Показатели острой токсичности изолятов бактерий рода *Bacillus*

Taosinga 2 Tiokasa tosin oo ipon tokon mootin noosistob oaktopini poga Baomac				
	Клиническое состояние животных при введении образцов			
Штаммы	бульонных культур в следующих разведениях			
	нативный	в разведении 1:10	в разведении 1:100	
B. licheniformis 2-1(2)-2 B. megaterium 3-1(1)-2 2-1 B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2)	интоксикация, от- каз от корма, гипо- и адинамия, вос- становление в те- чение 3 часов	угнетение, гиподина- мия, восстановление активности в течение 40 минут	гиподинамия, вос- становление двига- тельной активности в течение 15 минут	

В течение срока наблюдения (10 дней) у белых мышей не выявлено каких-либо побочных явлений или осложнений, случаев гибели не наблюдали.

Результаты предварительного этапа послужили основанием для выбора доз при проведении основного этапа исследования.

В таблице 3 представлены результаты временных интервалов угнетения и гиподинамии белых мышей при введении образцов бульонных культур изолятов бактерий рода *Bacillus* в разведениях от 1:2 до 1:32.

Таблица 3 – Определение оптимальных доз выделенных штаммов рода Bacillus

Штаммы	Разведения культуры					
штаммы	нативный	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
B. licheniformis 2-1(2)-2			60	40	30-35	20-25
B. megaterium 3-1(1)-2 2-1	3 часа 90-12	90-120 минут	60	_		
B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2)			минут	минут	минут	минут

Энтеральное введение белым мышам бульонных культур штаммов B. licheniformis 2-1(2)-2, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1, B. subtilis $\mathbb{N}^{\underline{o}}$ 3-1(1)-2 1(2) в нативном виде и во всех испытуемых разведениях не сопровождалось гибелью мышей. При увеличении вводимых доз культур бактерий рода Bacillus у белых мышей отмечали признаки угнетения и гиподинамии. Степень проявления симптомов угнетения и их продолжительность коррелировали с величиной испытуемой дозы.

Результаты определения амило- и целлюлолитической ферментативной активности выделенных изолятов бактерий рода Bacillus представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Амило- и целлюлолитическая ферментативная активность выделенных изолятов бактерий рода *Bacillus*

№ п/п	Штамм	Амилолитическая активность, ед.	Целлюлолитическая активность, ед.
1	B. licheniformis 2-1(2)-2	3,11	1,95
2	B. megaterium 3-1(1)-2 2-1	5,41	5,39
3	B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2)	5,02	2,9

Исходя из данных исследований, представленных в таблице 4, отобранные изоляты *B. li-cheniformis 2-1(2)-2, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1, B. subtilis* № 3-1(1)-2 1(2) характеризовались амилолитической активностью в диапазоне значений от 3,11 до 5,41 ед., и целлюлолитической активностью в значениях от 1,95 до 5,39 ед.

Результаты определения антибактериальной активности отобранных изолятов *B. licheniformis 2-1(2)-2, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1, B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2),* представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Антибактериальная активность выделенных изолятов бактерий рода Bacillus

	Тест-культура	Зоны задержки роста, мм		
Nº		B. licheniformis 2-1(2)-	B. megaterium 3-1(1)-	B. subtilis № 3-1(1)-
п/п		2	2 2-1	2 1(2)
1	Staphylococcus aureus	20	15	18
2	Streptococcus agalactiae	17	-	31
3	Salmonella dublin	25	23	21
4	Escherichia coli	-	27	24
5	Klebsiella pneumoniae	-	28	27

Наибольшей антибактериальной активностью обладал изолят B. subtilis 3-1(1)-2 1(2), подавляя рост тест-штаммов: Staphylococcus aureus – зона задержки роста 18 мм, Escherichia coli - зона задержки роста 24 мм, Salmonella dublin - зона задержки роста 21 мм, Klebsiella pneumoniae – зона задержки роста 27 мм, Streptococcus agalactiae – зона задержки роста 31 мм.

Учет результатов определения противовирусной активности проводился при условии отсутствия признаков дегенерации в контрольной культуре (без добавления образцов КЖ и вируса) и наличия ЦПД в контроле активности вируса.

Результаты изучения противовирусной активности КЖ штаммов рода Bacillus в отношении вируса диареи крупного рогатого скота представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты изучения противовирусной активности культуральной жидкости

штаммов рода Bacillus в отношении вируса диареи крупного рогатого скота

цитотоксичности
епарата

Примечания: ++ - наличие ЦПД вируса в культуре клеток; -- - отсутствие ЦПД вируса, монослой клеток сохранен.

В результате представленных в таблице 8 результатов исследований, установлено, что отобранные изоляты *B. licheniformis 2-1(2)-2, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1, B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2)* нетоксичны для культуры клеток и не обладают противовирусной активностью в отношении тест-штамма вируса диареи крупного рогатого скота.

Заключение. Для дальнейшего применения при конструировании пробиотических препаратов, предназначенных для лечения болезней желудочно-кишечного тракта молодняка сельскохозяйственных животных, из 12 изолятов бактерий рода Bacillus отобраны три культуры бактерий: B. licheniformis 2-1(2)-2, B. megaterium 3-1(1)-2 2-1 и B. subtilis № 3-1(1)-2 1(2), которые обладают амило- и целлюлолитической активностью, а также широким спектром антибактериального действия.

Литература. 1. Влияние препарата на основе фитолектинов и пробиотиков «Метафитохит» на обменные процессы телят при энтеритах / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : материалы V Международного съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 26–30 мая 2015 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины ; редкол. А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск, 2015. – С. 105–109. 2. Желдакова, Р. А. Выделение и идентификация микроорганизмов / Р. А. Желдакова. – Минск : БГУ, 2003. – 27 с. 3. Каменская, Т. Н. Микробная обсемененность помещений на комплексе по откорму крупного рогатого скота и их аэрозольная санация в присутствии телят / Т. Н. Каменская, С. А. Лукьянчик, Л. Л. Кривенок // Экология и животный мир. – 2017. – № 2. – С. 35–39. 4. Лечебная и профилактическая эффективность про- и пребиотических препаратов при инфекционных энтеритах тепят / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы Международной научно-практической конференции, Минск, 26—27 ноября 2015 г. / Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского ; редкол. П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – С. 114–117. 5. Олива, Т. В. Производство экологически безопасной продукции животноводства путем направленного формирования бактериоциноза кишечника молодняка животных / Т. В. Олива // Мировой опыт и перспективы развития сельского хозяйства : материалы Международной конференции, посвященной 95-летию Воронежскому государственному аграрному университету, Воронеж, 23-24 октября 2007 г. / Воронежский государственный аграрный университет. – Воронеж, 2008. – С. 115– 117. 6. Определение интерферониндуцирующей активности комплексного противовирусного препарата / П. А. Красочко [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 2. — С. 35–38. 7. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 2. С. 35–39. 8. Получение комплексного иммуностимулирующего противовирусного препарата на основе двуспиральной РНК и липополисахаридов бактерий / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 1. – С. 6–9. 9. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я. П. Яромчик // Молодые ученые - науке и практике АПК : материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых (г. Витебск, 5–6 июня 2018 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медииины. – Витебск : ВГАВМ. 2018. – С. 47–49. 10. Anagnostopoulos. C. Requirements for transformation in Bacillus subtilis / C. Anagnostopoulos, J. Spizizen // J. Bacteriol. - 1961. - Vol. 81. - P. 741-746.

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

УДК 619:577.27

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ФОРМА β-КАРОТИНА

*Бушмакина И.М., *Мартынова М.А., *Князева Е.В., **Красочко П.А.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Определен оптимальный состав липосомообразующей композиции, включающей основные и минорные стабилизирующие бислой компоненты, для инкорпорирования β -каротина (провитамина A) в липосомы методом вортэксирования. Установлено, что эффективность инкорпорирования β -каротина в липосомы достигает 100% от исходно внесенного при использовании соевого фосфатидилхолина и холестерина в молярном соотношении 10:1, витамина С - в концентрации 1,375 мг/мл суспензии, провитамина A - 11 мг/мл суспензии и антиоксиданта витамина $B \in \beta$ концентрации 0,16 мг/мг суммарных липидов. **Ключевые слова:** β -каротин, мультиламеллярные липосомы, пероксидное окисление липидов, электронная микроскопия.