

**Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИТИЧЕСКОЙ, ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛ**

*Показано взаимосвязь между антимикробной активностью пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140, их способностью продуцировать литические и целлюлозолитические ферменты. Пребиотики лактит и лактулоза положительно влияют на эти активности и усиливают процесс лизиса бациллами клеток условно-патогенных микроорганизмов.*

*Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, антимикробная активность, литические и целлюлозолитические ферменты, пребиотики.*

Аэробные спорообразующие бактерии характеризуются продукцией различных по природе биологически активных веществ, в том числе антибиотиков, литических и гидролитических ферментов [11].

Бактерии рода *Bacillus* широко известны как антагонисты многих условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Однако роль их литических ферментов, в том числе и различных гидролаз, в антагонистической активности остается не ясной. По имеющимся данным, литические ферменты *B. subtilis* в отличие от лизоцима яичного белка, с которым они имеют сходный спектр действия, представляют собой комплекс, который может включать глюканиазу, манназу, протеазу, амидазу, ацетилгексозаминидазу и другие ферменты с различной субстратной специфичностью [4, 11].

По данным одних исследователей, антимикробная активность бактерий рода *Bacillus* обусловлена лишь действием антибиотиков, а их способность продуцировать внеклеточные литические ферменты связана с их конкурентоспособностью в среде обитания за счет расширения доступных источников питания [6, 8]. В других работах синтез внеклеточных литических ферментов и гидролаз в комплексе рассматривается как один из механизмов антагонистического действия бацилл [3, 8, 9].

На сегодняшний день актуальной остается проблема изучения механизма антимикробного действия создаваемых синбиотиков с учетом



биологических свойств микроорганизмов, составляющих их основу. Эти исследования считают существенным этапом при разработке препаратов на основе живых микробных культур.

Цель настоящей работы состояла в изучении связи между литической, целлюлазной и антагонистической активностями пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140 и влияния на них пребиотиков лактата и лактулозы.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140 из коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, входящие в состав препарата эндоспорин [12].

В качестве тест-культур для определения литической и антагонистической активности бацилл использовали штаммы *Staphylococcus aureus* УКМ В-4001, *Escherichia coli* УКМ В-930, *Candida albicans* УКМ Y-690, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329, *Salmonella enterica* УКМ В-926, *S. thyphimurium* УКМ В-928.

Для изучения литической и антимикробной активностей бактерии выращивали при 37 °С в течение 24 ч в условиях глубинной культуры на качалке при 200 об/мин на глюкозо-минеральной синтетической среде следующего состава (г/л): глюкоза — 10,0—15,0; натрия цитрат — 1,29;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  — 4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 9,6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,18, pH 7,0±0,2. Для изучения целлюлозолитической активности бактерии выращивали в тех же условиях на среде с 0,5% целлюлозы без глюкозы [1]. В ряде опытов в качестве дополнительного источника углеродного питания использовали лактит или лактулозу (по 15%).

Литическую и целлюлозолитическую активности определяли известными методами [1, 6, 9]. Литическую активность выражали в процентах снижения оптической плотности (% ΔОП), что отражает процент лизиса клеток тест-культуры. Расчет проводили по формуле [6]:  $(D_0 - D) \cdot 100 / D_0$ , где  $D_0$  и  $D$  — ОП пробы соответственно до и после реакции. ОП реакционной смеси и контрольных проб измеряли с помощью ФЭК 56 при длине волны 540 нм до и после одного часа инкубирования при 41 °С в кювете толщиной 5 мм.

Результаты оценивали по данным 5 повторностей и считали достоверными при  $p < 0,05$ . Достоверность различия между средними значениями экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Проведенными исследованиями установлено, что штаммы бацилл проявляли выраженное ингибирующее рост действие как на грамотрицательные (*S. enterica*, *S. thyphimurium*, *E. coli*, *P. aerugi-*



nosa), так и на грамположительные бактерии (*S. aureus*), а также грибы (*C. albicans*). В опытах по отсроченному антагонизму зоны задержки роста составили  $16,0 \pm 1,0$  и  $9,0 \pm 1,0$  мм для штаммов *S. enterica*, *S. thyphimurium*, *E. coli*,  $22,0 \pm 1,0$  и  $16,0 \pm 1,0$  мм для *S. aureus* и *C. Albicans*, соответственно, штаммами *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140. *B. subtilis* УКМ 5140 проявлял более выраженное антагонистическое действие на *P. aeruginosa*, чем *B. subtilis* УКМ 5139, у которого зоны задержки роста составляли соответственно  $3,0 \pm 1,0$  и  $10,0 \pm 0,5$  мм (таблица).

Таблица

Антимикробные свойства штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140

Table

The antimicrobial properties of strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140

Тест-культура	<i>B. subtilis</i> УКМ 5139		<i>B. subtilis</i> УКМ 5140	
	Зона задержки роста, мм	Лизис тест-культуры, %	Зона задержки роста, мм	Лизис тест-культуры, %
<i>S. enterica</i> УКМ В-926	$16,0 \pm 1,0$	$13,3 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,5$	$16,7 \pm 20$
<i>S. thyphimurium</i> УКМ В-928	$17,0 \pm 2,0$	$14,2 \pm 2,0$	$10,0 \pm 1,0$	$25,7 \pm 1,0$
<i>E. coli</i> УКМ В-930	$15,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,75$
<i>P. aeruginosa</i> УКМ В-329	$3,0 \pm 1,0$	$10,0 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,5$	$10,0 \pm 1,0$
<i>S. aureus</i> УКМ В-4001	$23,0 \pm 2,0$	$2,5 \pm 1,0$	$15,0 \pm 1,0$	$5,3 \pm 1,0$
<i>C. albicans</i> УКМ Y-690	$22,0 \pm 1,0$	$16,6 \pm 2,0$	$18,0 \pm 1,0$	$16,6 \pm 1,0$

Как видно из рис. 1, изучаемые штаммы бацилл способны лизировать те же микроорганизмы, в отношении которых они проявляют антимикробный эффект. При этом процент лизиса живых клеток *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* составил в среднем до 15%. Сальмонеллы и *C. albicans* более чувствительны к литическому действию (выше 15%). По нашим данным, изучаемые штаммы *B. subtilis* имеют одинаковую литическую активность относительно *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, однако к сальмонеллам и *S. aureus* штамм *B. subtilis* УКМ 5140 был более активным. По-видимому, культуральная жидкость бацилл наряду с веществами антибиотической природы содержит литические ферменты, вызывающие лизис клеток тест-микроорганизмов, а антагонистическая активность бацилл зависит не только от антибиотических веществ, синтезируемых пробиотическими штаммами *B. subtilis*, но и от литических ферментов, продуцируемых ими. Очевидно, полученные результаты являются свидетельством роли литических ферментов в проявлении ан-

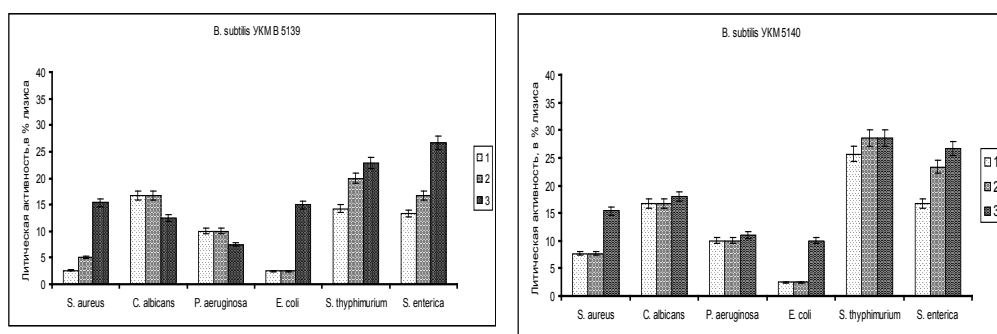


тагонистической активности бацилл, на что указывают и данные других исследователей [3, 8, 13].

Ранее нами показано, что изучаемые пробиотические штаммы *B. subtilis* способны также синтезировать и экскретировать в культуральную жидкость комплекс целюлаз ( $C_x$ -,  $C_1$ -,  $C_2$ -ферменты и целлобиазы) [1], что стало основанием предположить участие экзоцеллюлаз в антагонистической активности бацилл.

Для этого нами были определены литическая и антагонистическая активности культуральных жидкостей, полученных в условиях глубинного выращивания пробиотических штаммов на среде без целлюлозы и при выращивании их на той же среде с целлюлозой.

А



Б

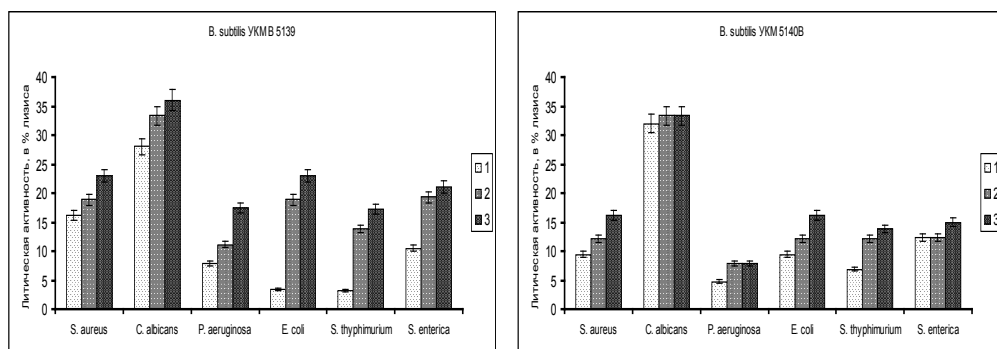


Рис 1. Литическая активность культуральных жидкостей штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на среде с лактитом и лактулозой

Обозначения: А — среда без целлюлозы, Б — среда с целлюлозой.

1 — *B. subtilis* на среде без добавок; 2 — *B. subtilis* на среде с лактитом;

3 — *B. subtilis* на среде с лактулозой.

Fig. 1. Lytic activity of strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140 at cultivation on medium in presence of lactitol and lactuloses

Notations: А — medium without cellulose, Б — medium with cellulose.

1 — *B. subtilis* on the medium without any additives; 2 — *B. subtilis* on the medium

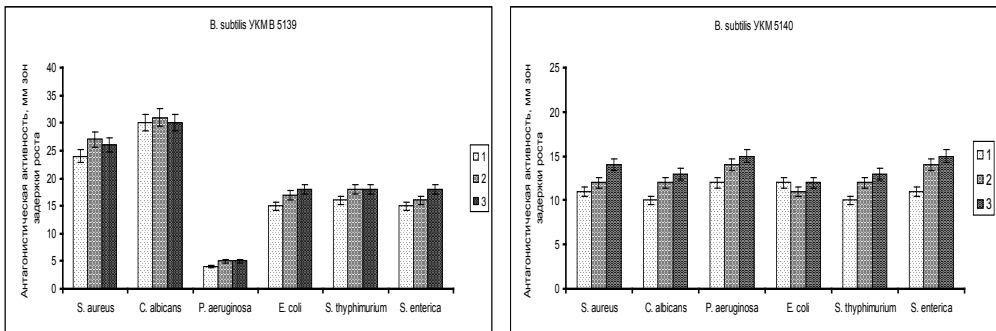
with lactitol; 3 — *B. subtilis* on the medium with lactulose .



Анализ полученных результатов показал, что культуральная жидкость исследуемых штаммов, содержащая целлюлазы, оказывает более выраженное литическое действие на клетки *C. albicans*, *S. aureus* и *E. coli*. При этом глубина лизиса указанных тест-культур была выше (27, 17 и 5%, соответственно) в культуральной жидкости, содержащей целлюлазы, чем в культуральной жидкости без них (17, 3, 3%, соответственно) (рис. 1).

Наряду с этим, антимикробная активность культуральной жидкости, содержащей целлюлазы, была выше относительно всех исследуемых тест-культур, чем культуральной жидкости, не содержащей целлюлазы (рис. 2). При этом штамм *B. subtilis* УКМ 5139 обладал антагонистической активностью, более выраженной, чем штамм *B. subtilis* УКМ 5140.

А



Б

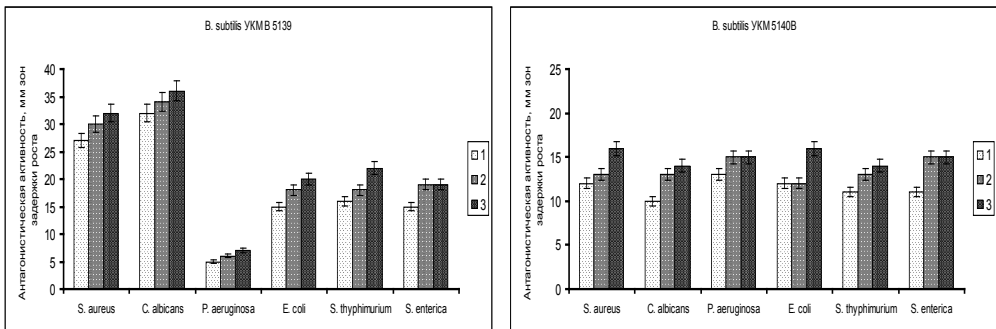


Рис 2. Антагонистическая активность культуральных жидкостей *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на среде с лактитом и лактулозой

Обозначения: те же, что на рис. 1.

Fig 2. Antagonistic activity of probiotic strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140 at cultivation on medium in presence of lactitol and lactuloses

Notations: the same as in fig. 1.



Хотя степень антагонистического воздействия культуральной жидкости пробиотических штаммов на исследуемые тест-микроорганизмы была разной, наблюдалась тенденция его усиления при наличии в культуральной жидкости целлюлаз. Так, если зоны задержки роста *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *S. thyphimurium* под действием культуральной жидкости *B. subtilis* УКМ 5139 без целлюлаз были 24, 30, 4, 15, 16, 16 мм, то под действием культуральной жидкости с целлюлазами они уже составили 27, 33, 6, 16, 17, 17 мм, соответственно. Культуральная жидкость с целлюлазами штамма *B. subtilis* УКМ 5140 отличалась несколько менее выраженным антагонистическим действием. При этом зоны задержки роста составили 13 мм для *S. aureus* и *P. aeruginosa*, 12 мм — для *E. coli* и 11 мм — для остальных тест-культур, что превышало лишь на 9–10% таковые под действием культуральной жидкости, не содержащей целлюлазы.

Общеизвестно, что активность ферментов, в том числе и литических, продуцируемых микроорганизмами, значительно может варьировать в зависимости от состава среды культивирования, в частности от источника углерода [5].

Ранее нами было показано, что введение в среду для культивирования пребиотиков лактата или лактулозы в качестве дополнительного источника углеродного питания, интенсифицирует биосинтез внеклеточных целлюлаз бацилл [2].

Добавление в среду лактата в разной степени влияет и на литическую активность бацилл по отношению к условно-патогенным тест-микроорганизмам. Этот пребиотик не влияет на литическую активность культуральной жидкости без целлюлаз относительно клеток *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Но в то же время, его присутствие в той же среде усиливает степень лизиса клеток сальмонелл и стафилококка (рис. 1).

Наличие лактулозы в среде оказывает более выраженное действие на уровень лизиса штаммами *B. subtilis* клеток *E. coli*, *S. aureus* и сальмонелл по сравнению с *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

Полученные нами результаты дают основание предположить участие комплекса экзометаболитов в проявлении антагонистической активности пробиотических штаммов *B. subtilis*. Однако строгой взаимосвязи и прямой корреляции между определяемыми активностями не установлено. Оба пробиотические штаммы проявляли антимикробный эффект, имея при этом различную литическую и целлюлозолитическую активности. Добавление в питательную среду дисахаридов-пребиотиков приводит к усилению как литической, так и антагонистической активности культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140. В случае присутствия в среде также целлюлаз их антимикробное действие усиливается и более выражено.



Таким образом, обобщая полученные результаты и литературные данные, можно заключить, что явление антагонизма бацилл как сложный многофакторный процесс, обуславливается комплексом их биологических свойств и основывается на совместном действии различных групп вторичных метаболитов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.И., Сафронова Л.А., Иляш В.М., Хархота М.А. Вплив рН поживного середовища на біосинтез гідролітичних ферментів у бацилл // Мікробіологічний журнал. — 2010. — Т. 72. № 5. — С. 3–7.
2. Авдеева Л.В., Осадчая А.И., Хархота М.А. Биосинтез целлюлаз пробиотическими штаммами *Vacillus subtilis* при совместном выращивании // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 4. — С. 80–89.
3. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Внеклеточные гидролазы штамма *Vacillus spp* 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 4. — С. 471–479.
4. Бизюлявичус Г.С. Антибактериальный спектр лизосубтилина Г10х// Антибиотики и химиотерапия. —1989. —Т. 34, № 8. — С. 579–581.
5. Боровикова В.П., Аксеновская В.Е., Лавренова Г.И. Выделение и характеристика литического фермента из *Vacillus spp. 797* // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 8. — С. 1524–1533.
6. Есикова Т.З., Темирнов Ю.В, Соколов С.Л., Алахов Ю.Б. Вторичные метаболиты антимикробного действия, продуцируемые термофильными штаммами *Vacillus spp* VK2 и VK21 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 261–267.
7. Кислухина О.В., Бизюлявичус Г.С. Изучение свойств препарата литических ферментов из культуры *Vacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология. — 1977. — Т. 13, № 1. — С. 55–60.
8. Павлова И.Н., Тиньянова Н.З., Жолкер Л.Г. Антимикробные свойства некоторых термофильных бацилл // Микробиологический журнал. — 1991. — Т. 53, № 1. — С. 84–89.
9. Смирнова И.Э. Целлюлолитические бактерии в защите сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов // Микробиология и фитопатология. — 2004. —Т. 38, № 2. — С. 89–93.
10. Смирнов В.В., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И., Сафронова Л.А. Литическая активность аэробных спорообразующих бактерий // Микробиологический журнал. — 2004. — Т. 66, № 2. — С. 35–46.
11. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. — Киев: Наукова думка, 1982. — 280 с.
12. Пат. Украина №76669 А61К35/74 Биопрепарат для лечения и профилактики кишечных инфекций у животных. / Сафронова Л.А., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Оpubл. 15. 08. 2006 Б. № 8.



13. Пат. 5374747 США, МКИ<sup>5</sup> C<sub>12</sub> N9/00, C<sub>12</sub> N9/20, Cell wall lytic enzymes from *Bacillus pabuli* /Liu Chi-di, Overholt J., Novo N. Заявл. 01.07.93; Опубл. 20.12.94.

**L.V. Avdeeva, A.I. Osadchaya, M.A. Kharkhota**

Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotnogo Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

## **LYTIC ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH CELLULOSELYTIC AND ANTAGONIST ACTIVITY OF BACILLI**

### **Summary**

The relationship between the antimicrobial activity of probiotic strains *Bacillus subtilis* УКМ 5139 and *Bacillus subtilis* УКМ 5140, their ability to produce the lytic and cellulolytic enzymes was studied. Prebiotics lactitol and lactulose influence positively on this activity and enhance the process of lysis by bacilli of conditional pathogenic microorganism's cells.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, antimicrobial activity, lytic and cellulolytic enzymes, prebiotics.

**Л.В. Авдєєва, А.І. Осадча, М.А. Хархота**

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

## **ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЛІТИЧНОЇ, ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНОЇ ТА АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАЦИЛ**

### **Реферат**

Показано взаємозв'язок антимікробної активності пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* УКМ 5139 і *Bacillus subtilis* УКМ 5140 та їх здатністю продукувати літичні і целюлозолітичні ферменти. Пребіотики лактит та лактулоза позитивно впливають на ці активності та підсилюють процес лізису бацилами клітин умовно-патогенних мікроорганізмів.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis*, антимікробна активність, літичні і целюлозолітичні ферменти, пребіотики.

Одержано 21.06.2011.

