

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ І.М. Д.К.ЗАВОЛОТНОГО

На правах рукопису

САФРОНОВА ЛАРИСА АНАТОЛІВНА

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS* I
І РОЗРОБКА НА ЇХ ОСНОВІ ЕФЕКТИВНОГО БІОПРЕПАРАТУ

03.00.07 – мікробіологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 1995 р.

AB 32, 368

Дисертацією в рукопис

Робота виконана у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України

Науковий керівник - доктор медичних наук,
академік НАН України,
професор В.В.Смирнов

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук,
професор С.М.Харченко

доктор біологічних наук
Н.К.Коваленко

Провідна організація - Дніпропетровський державний університет

Захист відбудеться 17 травня 1995 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.06.01 по присудженню наукового ступеня доктора біологічних наук у Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України /252143, Київ-143, вул.Заболотного, 154, Інститут мікробіології і вірусології НАН України, зал засідань/.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Інституту мікробіології та вірусології НАН України

Автореферат розісланий " ___ " _____ 1995р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Л.М.Пуриш

Л.М.Пуриш

ЛНБ України ім.В.Стефанька



00754900 (P)

ЛНБ ім. В. Стефанька
АН України

ТВ - 32.000

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми Бактерії роду *Bacillus* широко розповсюджені в навколишньому середовищі: в ґрунті, воді, повітрі, кормах, харчових продуктах та інших субстратах. Як наслідок цього, в травний тракт, дихальні шляхи та різні еконіші теплокровних тварин регулярно надходять значні кількості аеробних бацил. При цьому більшість з них не виявляють несприятливої дії на організм людини та тварин.

Аеробні спороутворюючі бактерії характеризуються високою і рівнобічною біологічною активністю, яка проявляється, зокрема, в продукції біологічно активних речовин, таких як ферменти, амінокислоти, в тому числі і незамінні, вітаміни, антибіотичні речовини, полісахариди і інші сполуки. Крім того, бактерії роду *Bacillus* при введенні їх в організм теплокровних, в певній кількості, стимулюють захисні реакції організму - активацію макрофагів, індукцію ендogenousого інтерферону, підсилення синтезу імуноглобулінів.

Бактеріям роду *Bacillus* притаманна також висока антагоністична активність у відношенні збудників різних захворювань. Однією з таких груп захворювань є широко розповсюджені післяпологові ендометрити великої рогатої худоби. Етіотропні засоби, що застосовуються для лікування ендометритів - антибіотики, сульфаніаміди, нітрофуранові та інші лікувальні препарати - часто не дають бажаного ефекту. Багато з них являються дефіцитними та дорогими для використання в тваринництві та ветеринарії. Тому розробка нових ефективних етіотропних засобів є необхідною і своєчасною.

В медицині та ветеринарії успішно застосовують ряд біологічних препаратів, що базуються на високій біологічній ак-

тивності живих мікробних культур. Однією з таких таксономічних груп мікроорганізмів є бактерії роду *Bacillus*.

Мета та завдання досліджень Метою даної роботи було вивчення біологічних властивостей штамів аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* та створення на їх основі ефективного біопрепарату для профілактики і лікування ендометритів сільськогосподарських тварин. При цьому були поставлені такі завдання:

1. Дослідити мікрофлору при ендометритах великої рогатої худоби та визначити основні етіологічні фактори даної патології.

2. Вивчити антагоністичні властивості бактерій роду *Bacillus* відносно збудників ендометритів та отримати високоактивні штами-антагоністи.

3. Дослідити біологічні, в тому числі патогенні, властивості штамів-антагоністів з метою визначення їх перспективності як основи для біопрепарату.

4. Отримати штами-антагоністи, найбільш придатні для конструювання біопрепарату.

5. Дослідити потреби в живленні, ростові властивості відібраних штамів бацил, продукування ними біологічно активних речовин та відпрацювати процес їх глибинного культивування.

6. Дослідити вплив штамів, відібраних для конструювання біопрепарату, на показники імунітету макроорганізму.

7. Отримати лабораторні зразки біопрепарату та провести попередні дослідження його лікувальної та профілактичної ефективності.

Наукова новизна Виділено широкий спектр можливих збудників ендометритів сільськогосподарських тварин і вперше у відповідності з сучасними уявленнями про систематику бакте-

рій проведена їх ідентифікація. Визначена етіологічна роль асоціацій виділеної патогенної та умовно патогенної мікрофлори у розвитку цієї патології і вперше показано, що спектр бактеріальних збудників має тенденцію до розширення. Цілеспрямовано отримані штами аеробних бацил, антагоністично активні відносно збудників ендометритів.

Досліджено комплекс біологічних властивостей активних антагоністів, необхідних при конструюванні біопрепарату для терапії запальних акушерсько-гінекологічних патологій.

Для культур *Bacillus subtilis*, що являються основою біопрепарату, розроблені дешеве, без харчових компонентів, рідке поживне середовище і спосіб високопродуктивного періодичного глибинного культивування при отриманні пробіотика.

Отримані дослідні лабораторні серії біопрепарату з титром $1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{11}$ життєдатних клітин і спор до 30-50 % на грам сухого препарату.

Вперше показано, що отриманий біопрепарат при інтравагінальному та внутрічеревному введенні стимулює неспецифічну резистентність організму лабораторних тварин, підвищує функціональну активність фагоцитів, індукує продукцію ендогенного інтерферону.

В дослідженнях, проведених в господарствах, вперше встановлена висока профілактична і терапевтична ефективність препарату на основі цілеспрямовано отриманих живих культур *Bacillus subtilis* при післяпологових ендометритах великої рогатої худоби.

Практичне значення роботи Розроблено біопрепарат для профілактики і терапії надзвичайно широко розповсюджених захворювань сільськогосподарських тварин, що проявляє антимікробні властивості, а також позитивно впливає на імуноло-

гічний статус макроорганізму.

Матеріали досліджень включені до Регламенту виробництва, Технічних умов, Настанови до застосування біопрепарату.

Апробація роботи Матеріали дисертації були подані на VII з'їзді Українського мікробіологічного товариства /Чернівці, 1989/, на IV Всесоюзній конференції "Мікроорганізмами в сільському господарстві" /Пушино, 1992, / на I установчому /VIII/ з'їзді УМТ /Одеса, 1993/.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 друкованих робіт.

Структура та об'єм роботи. Матеріали дисертації викладені на 200 сторінках машинописного тексту і складаються зі вступу, 2 глав огляду літератури, експериментальної частини, що включає опис матеріалів і методів роботи, та 4 глав власних досліджень, обговорення результатів, списку літератури, що вміщує 309 джерел, з них 121 на іноземній мові. Робота ілюстрована 29 таблицями та 17 малюнками.

З М І С Т Р О Б О Т И

Матеріали та методи досліджень. Об'єктами досліджень були штами аеробних спороутворюючих бактерій, одержані з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України, які були ізольовані з організму людини, тварин, грубих кормів, ґрунту та деякі музейні культури /всього 247 штамів 14 видів/, а також асоціативна мікрофлора, виділена при ендометритах великої рогатої худоби в кількості 284 штамів, з яких 117, що найчастіше зустрічаються при даній патології, були одержані в чистій культурі для подальших досліджень.

Як тест-культури для вивчення антагоністичної дії бацил

використовували 31 штам патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів різних таксономічних груп, які були одержані в музеїв Київського медичного університету, Київського інституту епідеміології і інфекційних захворювань, а також ізольовані від хворих тварин. Ідентифікацію виділених від тварин бактерій вели по багатьох культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостях /Биргер, 1982/. В основу ідентифікації покладені дані класифікації, викладені в 9 виданні визначника Берги /1984/ та монографії "The Prokaryotes" /Starr et al., 1986/.

Ферментативні активності аеробних спороутворюючих бактерій вивчали загальноновизнаними методами. Казеїназу, желатиназу, еластазу та лецитиназу активності визначали за величиною зон гідролізу відповідного субстрату навкруг колонії культури.

Лізоцимну активність досліджували методом Navigator /1968/.

Антагоністичну активність вивчали методом відсроченого антагонізму /Егоров, 1986/.

Токсигенні, токсичні та вірулентні властивості аеробних бацил досліджували по Биргер/1982/.

Чутливість до антибіотиків вивчали методом дифузії в агар з використанням стандартних індикаторних дисків.

Спороутворення досліджували при мікроскопії забарвлених за Грамом мазків 2-7- добових культур.

Титр бактерій визначали шляхом ряду послідовних розведень та висіву на агаризовані поживні середовища з посліду-чим підрахунком колоній, що вирости.

Вміст вільних амінокислот в культуральній рідині /КР/ вивчали на амінокислотному аналізаторі LC 5001 фірми

"Biotronic" /ФРН/ після відповідної обробки проб сульфасаліциловою кислотою за методикою, описаною Смирновим в співавторами /1983/.

Екзополісахариди виділяли з КР після відокремлення клітин за допомогою центрифугування та осадженням 96⁰ етанолом, переосадженням з водного розчину та висушуванням до постійної ваги /Захарова, Косенко, 1982/.

Кількість амінного азоту в КР визначали методом формольного титрування /Великая, Суходол, 1983/.

Оптимізацію складу поживного середовища здійснювали за допомогою методу математичного планування експерименту /Бирюков, 1975/.

Вплив на продукцію ендогенного інтерферону асоціації культур /*B. subtilis* 39 і *B. subtilis* 51/ визначали за загальноновизнаним методом /Эмрих, 1987/. Визначення фактору гальмування міграції макрофагів /MIF/ проводили в капілярах за методикою Фрімелля /1987/.

Вплив асоціації культур /*B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51/ на бактерицидну активність макрофагів перитонеального ексудату визначали методом люмінол-залежної хемілюмінесценції /Маянський та ін., 1987/.

Біопрепарат одержували двома методами: поверхневим способом і шляхом глибинного культивування, розробленого нами для даних культур.

Профілактична і лікувальна ефективність лабораторних зразків одержаного препарату досліджувалась разом зі співробітниками факультету ветеринарної медицини Українського національного аграрного університету /УНАУ/ в різних варіантах дослідів на коровах при внутриматочному та внутривагінальному введенні препарату.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Мікрофлора при ендометритах великої рогатої худоби

1.1. Виділення та ідентифікація мікрофлори при ендометритах великої рогатої худоби.

Оскільки мета даної роботи припускала створення на основі спороутворюючих бактерій біопрепарату для профілактики і лікування ендометритів сільськогосподарських тварин, початковим етапом наших досліджень було виявлення спектру можливих бактеріальних збудників даної післяполової патології.

Результати показали, що етіологічним фактором гнійно-катаральних ендометритів є асоціації бактерій. В асоціаціях, висіяних з 107 проб, виявлено 284 штами бактерій, що відносяться до різних таксономічних груп /табл.1/.

Кишкова група була найбільш чисельною / 42,6 % серед зареєстрованих в асоціаціях штамів. В чистій культурі із асоціацій було ізольовано 117 штамів. Вивчені їх морфолого-культуральні та біохімічні властивості і проведена ідентифікація виділених видів у відповідності з сучасними уявленнями систематики бактерій /Bergey, 1984/.

1.2. Характеристика мікрофлори, виділеної при ендометритах великої рогатої худоби.

Досліджені патогенність і чутливість відібраних 117 чистих культур до широкого набору антибіотиків з метою з'ясування їх етіологічного значення та прогностичної оцінки можливої ефективності сучасних терапевтичних і профілактичних засобів, які застосовуються в ветеринарії.

Близько 60% штамів бактерій викликали у дослідних мишей

Таблиця 1

Мікрофлора, виділена при гострих післяпологових ендометритах великої рогатої худоби

Група бактерій	Всього штамів в асоціаціях		Види бактерій в асоціаціях	Чисті культури	
	кільк.	%		кільк.	%
Грамнегативні аеробні і факультативно-аеробні палички	121	42,6	<i>E.coli</i>	48	41
			<i>Proteus vulgaris</i>	6	5,2
			<i>P.mirabilis</i>	7	6
			<i>P.morgani</i>	1	0,9
			<i>Salmonella sp.</i>	6	5,1
			<i>Serratia sp.</i>	3	2,5
Неферментуючі та ін. грамнегативні палички	31	10,9	<i>P.aeruginosa</i>	1	0,9
			<i>Pseudomonas sp.</i>	4	3,5
			<i>Moraxella sp.</i>	3	2,5
			<i>A.calcoaceticus</i>	5	4,2
			<i>A.faecalis</i>	3	2,5
Грамположитивні аеробні палички	79	27,8	<i>B.subtilis</i>	16	13,6
			<i>B.cereus</i>	1	0,9
			<i>Mycobacterium sp.</i>	2	1,7
Грамположитивні аеробні і факультативно анаеробні коки	50	17,6	<i>Micrococcus sp.</i>	1	0,9
			<i>S.aureus</i>	4	3,5
			<i>S.faecalis</i>	1	0,9
			<i>S.faecium</i>	2	1,7
			<i>S.pyogenes</i>	1	0,9
Дріжджеподібні клітини	3	1,1	<i>Candida sp.</i>	3	2,5
Всього	284	100		117	41,2

захворювання. Сорок п'ять процентів культур від загальної кількості досліджуваних, викликали не лише ознаки захворювання, але і загибель дослідних тварин. Найбільшу хвороботворну дію на мишей виявляли бактерії з родини Enterobacteriaceae. Патогенні властивості виявляли більшість штамів кишкової палички і всі досліджувані штами бактерій із родів Proteus, Salmonella, Serratia. Разом з тим, білі миші виявились нечутливими в умовах дослідів до представників родів Moraxella, Acinetobacter, Alcaligenes, а також до штамів грампозитивних коків, дріжджеподібних грибів і аеробних бацил.

Одержані дані свідчать про те, що більша кількість виділених при ендометритах бактерій різних видів мають патогенні властивості.

Результати дозволяють розглядати виділені види бактерій, за невеликим винятком, як можливих збудників ендометритів великої рогатої худоби. При дослідженні виділених бактерій на чутливість до широкого спектру антибіотиків, переважна більшість штамів виявились стійкими до багатьох досліджених антибіотиків. Найбільша кількість штамів всіх видів /більше 40%/ виявили чутливість до гентаміцину і левоміцети-ну. Стійкість до всіх антибіотиків встановлена у 30 штамів, тобто, у більш, ніж 25%.

Таким чином, жоден з 117 штамів досліджених нами видів не був чутливим до всіх 18 випробуваних антибіотиків. Сто одинадцять штамів були стійкими до 5 і більше антибіотиків, тобто були полірезистентними.

Встановлена пряма залежність між стійкістю до антибіотиків бактерій-збудників гострих ендометритів і їх вірулентністю. Всі вірулентні штами були практично стійкими до всіх

антибіотиків.

2. Бактерії роду Bacillus - антагоністи збудників ендометритів

2.1. Антагоністична активність штамів Bacillus у відношенні збудників ендометритів.

Нами показано, що мікробний фактор є одним з ведучих в етіології захворювань, що розглядаються. Тому необхідна розробка нових високоефективних етіотропних засобів.

Оскільки феномен антагонізму лежить в основі всіх використовуваних на практиці пробіотиків, наступним етапом роботи був відбір активних штамів-антагоністів відносно збудників. Перш за все антагоністичні властивості штамів аеробних спороутворюючих бактерій були досліджені у відношенні до мурейних гноетворних тест-культур. Були відібрані найбільш активні антагоністи. Найбільшу антагоністичну активність виявляли штами *B. subtilis*. Досліджена їх активність у відношенні мікрофлори, ізолюваної від хворих тварин. З загальної кількості виділених збудників, як тест-культури були взяті такі, які найчастіше висівалися при даному захворюванні, з вираженими патогенними властивостями і множинною стійкістю до антибіотиків.

Одержані результати дозволили вважати практично весь спектр можливих збудників гнійних ендометритів чутливим до антагоністичної дії багатьох штамів досліджених аеробних бацил. Ряд штамів проявляв цей антагонізм в високій мірі.

Стійкість гноетворних бактерій до антибіотиків не впливала на їх чутливість до антагоністичної дії аеробних бацил.

2.2. Біологічні властивості штамів-антагоністів.

Для більш повної характеристики виявленої групи штамів аеробних спороутворюючих бактерій-активних антагоністів були досліджені і інші їх біологічні властивості. Всі штами виявляли властивість гідролізувати желатин, казеїн, еластин, крохмаль /табл.2/. Наявність ферментативної активності важлива, оскільки одним з факторів, які визначають лікувальну дію препаратів з живих мікробних культур, може бути їх здатність до утворення високоактивних ферментів, зокрема, протеаз /Павлова та ін., 1992; Ngok, 1988/.

Для одержання додаткових відомостей про антимікробні властивості відібраних штамів вивчена їх лізоцимна активність. Штами аеробних бацил були також досліджені на можливість продукції ними гемолізинів, лецитиназ та коагулаз. Ці речовини належать до ознак патогенності бактеріальних культур, тому штами, які утворюють їх, не варто використовувати як основу для препарату / табл.2/.

Таблиця 2.
Ферменти, що продукуються штамми-антагоністами роду *Bacillus*

Ферменти	Кількість штамів бацил		
	<i>B.subtilis</i>	<i>B.licheniformis</i>	<i>B.firmus</i>
желатиназа	46	2	1
казеїназа	48	3	1
еластаза	48	2	0
амілаза	46	3	1
гемолізин	34	2	0
коагулаза	0	0	0
лецитиназа	2	0	0
лізоцим	44	3	1
Загальна кількість штамів	46	8	1

Таблиця 3.
Спектр та ступінь антагонізму високоактивних штамів *B.subtilis*

Тест-культури	Номери і активність штамів в мм зон затримки росту тест культур					
	39	51	60	87	99	107
<i>S.aureus</i> 209	24	10	28	22	23	14
<i>S.aureus</i> K 13	25	10	28	28	25	26
<i>E.coli</i> 070	20	12	25	19	16	18
<i>E.coli</i> K 125	15	8	19	22	26	22
<i>P.vulgaris</i> 4-8	28	16	28	26	28	25
<i>P.morgani</i> K 92	21	10	19	24	28	17
<i>P.mirabilis</i> K 77	28	15	12	25	20	17
<i>K.pneumoniae</i> T-24	3	0	8	2	4	3
<i>S.sonnei</i> 659	27	15	28	17	28	19
<i>S.typhi</i> 11	18	12	20	12	20	14
<i>Salmonella</i> sp. K 106	12	5	10	12	7	10
<i>C.michiganense</i> 37	0	12	5	15	4	0
<i>C.albicans</i> 690	30	10	28	26	28	26
<i>Acinetobacter</i> sp. K 73	2	10	4	4	0	2
<i>Pseudomonas</i> sp. K 16	10	20	14	20	2	10
<i>P.aeruginosa</i> 4141	5	20	8	6	10	2
<i>P.aeruginosa</i> K 135	2	10	2	4	3	6
<i>Moraxella</i> sp. K 3	0	10	4	3	5	4

Вірулентність була вивчена в дослідках на лабораторних тваринах, оскільки пряме визначення цієї властивості найбільше характеризує патогенетичний потенціал бактерій.

З урахуванням ряду корисних біологічних властивостей, високої антагоністичної активності і відсутності вірулентності були відібрані шість штамів бацил /табл.3/. Проведене більш глибоке дослідження їх токсичності та вірулентності при внутрішньочеревному та пероральному введенні. Досліди in vivo показали відсутність у них патогенних властивостей.

Результати дослідження взаємного антагонізму відібраних високоактивних штамів *Bacillus subtilis* показали, що деякі з них можуть виявляти внутрішньовидовий антагонізм, що неприпустимо для їх спільного використання, як основи біопрепарату.

Табл.4.
Біологічні властивості відібраних штамів-антагоністів і їх асоціації

Штам	Біологічна активність									
	Зона затримки росту /мм/					Зона гідролізу, лізису /мм/				
	St. au- K13	E. oo- li K125	P. mor- gani K92	Aci- neto- bac- ter	P. ae- rugi- nosa K135	же- ла- ти- ну	казе- їну моло- ка	елас- тіну	кро- хма- лю	кли- тин M. lu- teus 2665
B. sub- tilis 39	27	20	21	2	2	6	8	4	8	25
B. sub- tilis 51	5	6	7	14	12	5	11	3	10	0
Асоці- ація штамів	22	20	18	14	10	6	10	4	8	24

В остаточному підсумку, проведені дослідження дозволили відібрати два штами, що характеризувалися повною нешкідливістю і комплексом властивостей, що дають підставу для використання їх як основи лікувально-профілактичного препарату /табл.4/.

Дослідження біологічної активності асоціації показали, що жодна з властивостей, характерних для кожної з бактеріальних культур *B.subtilis* 39 і *B.subtilis* 51, при їх змішуванні не втрачається.

3. Фізіолого-біохімічні характеристики активних штамів-антагоністів

3.1. Потреби в живленні і ростові властивості.

Досліджено вплив різних джерел азоту і вуглецю на ріст і розвиток в глибинних умовах культивування штамів *B.subtilis* 39 і *B.subtilis* 51 з метою створення найбільш оптимального середовища для одержання препарату.

Оцінку джерел живлення проводили по накопиченню біомаси штамми і зміною рН середовища в кінці ферментації.

Контролем було модифіковане нами /Кудрявцев та ін., 1991/ середовище Sato /Sato, Anaquchi, 1984/, що вміщувало сульфат амонію, як джерело азоту і глюкозу, як джерело вуглецю.

Найбільш високі і стабільні результати по стимулюванню росту бактерій з максимальною кількістю біомаси 1,9 - 4,09 г/л і чисельністю живих клітин 81,7 - 321,9 млн клітин в 1мл середовища, одержані на середовищах, що містять дріжджі або кукурузний екстракт. Одержані в даному випадку показники в 3,5 - 4,0 раз перевищують рівень контрольного середовища /без органічного азоту/. На цих середовищах кращий ефект давали

добавки кукурузного екстракту в концентрації 50 мг% за амінім азотом.

Найбільш ефективними з випробуваних джерел вуглеводів є меласа і зелена патока. Рівень оптичної щільності, що реєструється, складає $3 \pm 0,53$ і $3,55 \pm 0,71$ відповідно кожному штаму і перевищує на 170% і більше рівень контрольного середовища.

На ріст і метаболізм бактерій впливає концентрація і співвідношення джерел вуглецю і азоту, які входять до середовища. Корективка концентрацій компонентів, що входять до середовища і забезпечують біосинтетичну активність штамів, здійснювалась з використанням математичного методу планування експерименту. Це дозволило одержати максимальний вихід біомаси з високим титром життєдатних клітин $1 \cdot 10^9$ - $1 \cdot 10^{10}$ кл/мл, що утворюють за 24 години ферментації в глибинних умовах 50% і більше спор.

Таким чином, розроблене нами середовище /джерело азоту-кукурузний екстракт, вуглецю - зелена патока/ більш сприятливе, ніж контрольне, для глибинного культивування штамів *B.subtilis*.

3.2. Синтез біологічно активних речовин.

Відомо, що механізми лікувально-профілактичної дії пробіотиків із бацил мають багатофакторний характер /Смирнов і ін., 1993/. Однією з ланок цього механізму є здатність бактерій роду *Bacillus* до синтезу ряду біологічно активних субстратів. До таких субстратів належать амінокислоти і полісахариди, можливість синтезу яких штамми *B.subtilis* 39 і *B.subtilis* 51 і його регуляцію ми досліджували в своїй роботі.

Встановлено, що досліджувані штами здійснюють прямий синтез і накопичення поваклітинних амінокислот на простому глюкозо-мінеральному середовищі, оптимізованому нами. Цей процес можливо регулювати шляхом створення оптимальних умов культивування, зокрема, підбором джерел вуглеводного та азотного живлення. Нами було випробувано 11 джерел вуглеводного і 22 джерела азотного живлення /органічного і неорганічного/. Так, на середовищах, що містять зелену патоку, продукування амінокислот збільшилось на 43,0-271% у порівнянні з контролем, меласу - на 38,0 - 247%, козлогоу - на 12-53%.

Однак, вирішальним фактором для синтезу і екскреції амінокислот в середовище є джерела органічного азоту. Так, при внесенні в поживне середовище кукурузного екстракту, продукування амінокислот збільшилось в 2,6 раз, дріжджового екстракту - в 5,1-18,4 рази, а дріжджового автолізату - в 10,2 -27,8 рази.

Таким чином, можна констатувати, що досліджувані штами є активними продуцентами таких важливих для макроорганізму вільних амінокислот, як глутамінова, що складає від 15 до 76,4% від загального вмісту амінокислот в утворенні пулі, валіну - до 68% проліну -54,5, що залежить від умов культивування. Ароматичних амінокислот -триптофану, тирозину, гістидину, фенілаланіну - може бути у створеному препараті всього 45,5; 25,5; 8,5; 7% відповідно. Але всі вони мають важливе значення для організму теплокровних.

Нами встановлено, що штами *B.subtilis* 39, *B.subtilis* 51 синтезують екалопідсахариди /ЕПС/ в глибинних умовах культивування на середовищі з зеленою патокою, як джерелом вуглецю, і кукурузним екстрактом, як джерелом органічного азоту.

Вивчення синтезу полісахаридів досліджуваними штамми в динаміці їх розвитку показало, що найвища інтенсивність продукування ЕПС співпадає з експоненціальною фазою росту і за часом настає вже на 6-ту годину культивування.

Показана можливість регулювання біосинтезу ЕПС шляхом аміни рівня аерації / 1,8 - 5,8 г O_2 /л.год./ . Найбільший рівень накопичення полісахаридів в середовищі відмічений при аерації, відповідній 4,4 г O_2 /л.год./ . При цьому ростові показники досліджуваних продуцентів зберігаються на попередньому рівні, але максимально досягнутий в цих умовах вихід полісахаридів різний за абсолютною величиною і складає для *B.subtilis* 39 11,8 г/л, *B.subtilis* 51 - 9,2г/л.

3.3. Вплив на показники імунітету.

Ще однією важливою характеристикою штамів, призначених для конструювання лікувально-профілактичних біопрепаратів, є їх вплив на захисні реакції макроорганізму, що визначають його імунореактивність.

Одержані дані свідчать про те, що інтравагінальне або внутриверевне введення в організм дослідної тварини асоціації культур *B.subtilis* 39, *B.subtilis* 51 стимулює бактеріцидну і поглинальну активність макрофагів перитонеального ексудату мишей /МШПЕ/. Це може мати велике позитивне значення у визначенні наслідків взаємодії збудника з факторами захисту макроорганізму, наприклад, при гнійній інфекції.

Характерною особливістю функціональної активності фагоцитів є також їх здатність до міграції / вихід з місця локалізації до місця запалення/. Встановлено, що введення асоціації штамів *B.subtilis* 39, *B.subtilis* 51 веде до стимуляції міграційної активності МШПЕ і лейкоцитів крові. Виявлено

також, що у відповідь на введення досліджуваних бактеріальних культур стимулюється індукція α -інтерферону в організмі тварин з максимальним значенням через 6 годин. Відомо, що система інтерферонів чинить різні дії: імуномодуючу, антибактеріальну, протівірусну і інші /Dahl, Degre, 1983/.

Отже, досліджуваним штамам аеробних спороутворюючих бактерій притаманна здатність до вираженої стимуляції захисних сил організму теплокровних.

4. Біопрепарат на основі штамів *Bacillus subtilis*

і його специфічна активність

З числа досліджених 247 штамів різних видів аеробних спороутворюючих бактерій оптимальною для створення біопрепарату одержана комбінація двох штамів *B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51, які є вираженими антагоністами можливих збудників післяпологових ендометритів великої рогатої худоби і доповнюють один одного за спектром антагоністичної та інших біологічних активностей.

Ці штами здатні до продукції ряду ферментів, амінокислот і полісахаридів, що послужило підставою для включення їх в склад біопрепарату з живих мікробних культур, призначеного для етіотропної терапії ендометритів.

Для одержання біопрепарату в лабораторних умовах проведені дослідження по роздільному культивуванню штамів *B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51 в колбах і ферментерах. Культури вирощували на рідкому поживному середовищі, розробленому нами раніше. На даному поживному середовищі було досягнуто максимальної для обох штамів кількості життєздатних клітин від 10^9 до 10^{10} в 1мл і утворення спор від 30 до 50% загальної кількості клітин.

Таблиця 5.

Біологічно активні речовини в серіях біопрепарату

		Біологічна активність												
№	Серія препарату	Зона гідролізу, ліаісу, мм						позаклітинні амінокислоти, мг/л					екзо- полі- сахариди, г/л	
		лецитину	еритр. крові	желез. тину	елас. тину	казеїну	клітин. M. luteus 2665	гістидин	пролін	валін	глютамін	аланін		лізін
1.	10290	0	0	6	3	9	26	25	38	30	28	45	12	5,2
2.	20390	0	0	5	2	11	26	35	40	28	35	58	11	6,7
3.	30490	0	0	6	4	10	25	38	42	35	40	61	15	8,3
4.	41090	0	0	4	3	11	24	30	47	26	42	49	19	7,4
5.	50291	0	0	6	4	9	24	31	50	41	39	41	20	9,0
6.	60591	0	0	4	4	9	26	39	52	24	41	60	10	7,8
7.	70991	0	0	5	2	10	25	26	48	31	29	42	12	8,5
8.	80192	0	0	3	2	11	25	28	41	36	43	51	18	5,0
9.	90292	0	0	5	3	9	26	32	36	40	30	49	13	7,7
10.	100793	0	0	4	4	11	24	35	53	38	38	57	10	6,1

Виготовлені 10 лабораторних серій препарату, які досліджували на нешкідливість в дослідках *in vivo* і вміст біологічно активних речовин.

Встановлено, що одержаний біопрепарат зберігає властивості культур, які складають його /табл. 5/, нешкідливий для макроорганізму, характеризується позитивною дією на імунологічний статус організму теплокровних.

Виконані дослідження по розробці біопрепарату дозволили спільно з співробітниками факультету ветеринарної медицини УНАУ дослідити ефективність біопрепарату при профілактиці та лікуванні ендометритів великої рогатої худоби в умовах господарства. Акти про проведення цих дослідів подані в дисертації. Результати використання біопрепарату з живих мікробних культур показали його виражену терапевтичну дію при гострих післяпологових ендометритах і затриманні посліду, а також як ефективного профілактичного засобу. При цьому якийсь ускладнень, виражених клінічно, не спостерігалось. Зниження продуктивності молока, погіршення його якості не відмічено.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що етіологічними факторами післяпологових гнійно-катаральних ендометритів є асоціації патогенної та умовно патогенної гноєтворної мікрофлори, яка в більшості своїй є антибіотикорезистентною.

2. Найбільшу питому вагу в асоціаціях при гострих ендометритах великої рогатої худоби складають бактерії кишкової групи, грампозитивна кокова мікрофлора. При даній патології частіше висіваються нокардіоподібні бактерії, бактерії родів *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*.

3. Вперше показана висока антагоністична активність бактерій роду *Bacillus* відносно мікрофлори, виділеної при ендометритах великої рогатої худоби. Найбільша активність притаманна штамам *Bacillus subtilis*.

4. Вивчення біологічних властивостей 247 штамів 14 видів бактерій роду *Bacillus* дозволило відібрати два штами *Bacillus subtilis* як основу для нового біопрепарату.

5. Відібрані штами продукують в середовище комплексо протеолітичних ферментів, амінокислот і екаполісахаридів.

6. Оптимізовані варіанти поживних середовищ, підібрані умови високопродуктивного періодичного глибинного культивування штамів *Bacillus subtilis*, відпрацьовано спосіб одержання біопрепарату.

7. Одержані лабораторні серії біопрепарату, які вміщують життєдатні клітини в кількості $1,0 \cdot 10^{10}$ - $1,0 \cdot 10^{11}$, а спори - до 30-50% в грамі сухого препарату.

8. Розроблений біопрепарат характеризується високою антагоністичною активністю у відношенні до мікрофлори, виділеної при ендометритах. При інтравагінальному та внутрішньочеревному введенні препарат стимулює неспецифічну резистентність організму лабораторних тварин.

9. Біопрепарат виявляє виражену терапевтичну і профілактичну ефективність при післяпологових ендометритах великої рогатої худоби.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Чуркина Л.Н., Вьжницкая В.А. К вопросу о плазмкоагулаге бактерий рода *Bacillus* //Микробиол.журн. -1988. -50, N4. -с.51-53.
2. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Козачко И.А. и др.

- Микрофлора при гнойно-катаральных эндометритах крупного рогатого скота //Микробиол.журн.-1991. -53, N2. -с.3-9.
3. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Ковачко И.А. Подбор состава среды для оптимизации аминосинтетической активности аэробных бацилл //Микробиол.журн. -1991. -53, N4. -с.68-73.
 4. Сафронова Л.А., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Характеристика микрофлоры, выделенной при эндометритах крупного рогатого скота //Микробиол.журн. -1991. -53, N6. -с.71-77.
 5. Смирнов В.В., Реаник С.Р., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Сафронова Л.А. Внеклеточные аминокислоты аэробных спорообразующих бактерий //Микробиология. -1992. -61, N5. -с.65-72.
 6. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Реаник С.Р., Вьюницкая В.А., Сафронова Л.А., Смирнов В.В. Влияние условий аэрации на синтез и экскрецию полисахаридов бактериями рода *Bacillus* при их глубинном культивировании //Биотехнология. -N3. -с.12-15.
 7. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И. и др. Антагонизм аэробных спорообразующих бактерий к возбудителям эндометритов крупного рогатого скота //Микробиол.журн.-1993. -55, N2. -с.74-82.
 8. Смирнов В.В., Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Рост и спорообразование *Bacillus subtilis* в различных условиях аэрации //Микробиол.журн. -1993. -55, N3. -с.38-43.
 9. Сафронова Л.А., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Перспективность аэробных спорообразующих бактерий для терапии и профилактики гнойно-септических послеродовых заболеваний сельскохозяйственных животных: Материалы 1 Установочного /VII/ съезда Укр.микробиол.о-ва //Микробиол.журн.-1994. -56, N4. -с.86.

10. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Синтез внеклеточных аминокислот спорообразующими аэробами на синтетической питательной среде //Тез.докл. VII съезда Укр.микробиол.о-ва -Киев-Черновцы: Наукова думка. -1989. -с.67.
11. Kudryavtsev V.A., Osadchaya A.I., Safronova L.A., Kosachko I.A. Extracellular aminoacids of aerobic sporo-forming bacteria /IUMS Congress:Bacteriology, mycology /Osaka, 16-22 september 1990/.-Osaka, 1990. -p.92.
12. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Кудрявцев В.А. Перспективность аэробных спорообразующих бактерий для терапии и профилактики гнойно-септических послеродовых заболеваний сельскохозяйственных животных //Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тез.докл. IV Всесоюз. науч. конф. /Пушино, 20-24 января 1992 г./-Пушино, 1992. -с.180-181.

Сафронова Л.А. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis* и разработка на их основе эффективного биопрепарата.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.07-микробиология, -Киевский институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, 1995.

РЕЗЮМЕ

Изложены результаты экспериментальных исследований биологических свойств штаммов аэробных спорообразующих бактерий. Из их числа отобраны высоко активные и безвредные для теплокровных с выраженным антагонизмом по отношению к исследованным возбудителям послеродовых эндометритов сельскохозяйственных животных. Показано, что отобранные культуры стимулируют неспецифическую резистентность макроорганизма. С целью разработки эффективного пробиотика, отработан процесс их глубинного культивирования. Исследования лабораторных серий биопрепарата показали его выраженное лечебное и профилактическое действие при эндометритах.

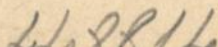
Ключові слова: аеробні спороутворюючі бактерії, ендометрити сільськогосподарських тварин, антагоністична активність, глибинне культивування, показники імунітету, біопрепарат.

Safronova L.A. Biological properties *Bacillus subtilis* strains and development of the effective biopreparation on their base.

The Candidate Thesis for Philosophy Doctor Degree, the Speciality 03.00.07.-Microbiology-Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1995.

S U M M A R Y

The experimental investigation results of the biological properties of the aerobic sporeforming bacteria have been expounded. High-active and harmless for hot-blood with a pronounced antagonism on pathogenic agents have been selected from their number. It is shown that selected strains stimulate nonspecific resistance of the macroorganism. High-productive process of the deep cultivation was perfected with the aim to development of the effective probiotic. The laboratory investigations of the biopreparation series showed pronounced treatment-prophylactic action with endometrites.



AB 32.368