

Противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3H и *Bacillus subtilis* 1719

С.А. Лазарев, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Antimicrobial and enzymatic properties of *Bacillus subtilis* 3H and *Bacillus subtilis* 1719 probiotic strain metabolites

S.A. Lazarev, N.A. Mikhailova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Аннотация

Бактерии *Bacillus subtilis* являются продуцентами широкого спектра биоактивных соединений, перспективных для создания пробиотических препаратов нового поколения – метабитиков. Целью работы являлось изучение противомикробных и ферментативных свойств метаболитов, полученных при глубинном культивировании штаммов *B. subtilis* 3H и *B. subtilis* 1719. Противомикробную активность в отношении тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов изучали методом диффузии в агар. Протеолитические и амилолитические свойства оценивали по способности гидролизовать казеин и крахмал. Белковый состав метаболитов анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли. В результате проведенного исследования установлено, что противомикробная активность исследуемых метаболитов сосредоточена во фракции с молекулярной массой <5 кДа и имеет штаммоспецифические особенности. Метаболиты *B. subtilis* 3H наиболее активны в отношении бактерий *S. aureus* FDA 209P (26±2,1 мм) и *C. albicans* 927 (21,7±1,7 мм). Метаболиты *B. subtilis* 1719 наиболее активны в отношении тест-штаммов *P. mirabilis* 24a (20,7±1,7 мм) и *E. coli* ATCC 25922 (14±1,1 мм). Ферментативная активность проявлялась во фракции с молекулярной массой >30 кДа. Метаболиты *B. subtilis* 1719 обладали более высокой активностью, о чём свидетельствовали зоны гидролиза на молочном (31,7±0,9 мм) и картофельном (27±0,6 мм) агарах. Выявленные свойства метаболитов открывают перспективу для дальнейшего исследования с целью разработки новых пробиотических препаратов.

Ключевые слова

Bacillus subtilis 3H, *Bacillus subtilis* 1719, метаболиты *B. subtilis*, метабитики.

Введение

Качественные и количественные изменения микробного состава биотопов организма (дис-

Summary

Bacillus subtilis produce a wide range of bioactive compounds rendered promising for the creation of a new generation of probiotic preparations known as metabiotics. Aim of the work was to study the antimicrobial and enzymatic properties of metabolites obtained by deep cultivation of *B. subtilis* 3H and *B. subtilis* 1719 strains. Antimicrobial activity against test strains of opportunistic microorganisms was studied using the agar diffusion method. Proteolytic and amylolytic properties were evaluated by the ability to hydrolyze casein and starch. Protein composition of the metabolites was analyzed via polyacrylamide gel electrophoresis according to the Laemmli method. It was found that the studied metabolites' antimicrobial activity is concentrated in the fraction with a molecular weight of <5 kDa and has strain-specific features. *B. subtilis* 3H metabolites are most active against *S. aureus* FDA 209P (26±2.1 mm) and *C. albicans* 927 (21.7±1.7 mm). *B. subtilis* 1719 metabolites are most active against *P. mirabilis* 24a (20.7±1.7 mm) and *E. coli* ATCC 25922 (14±1.1 mm) test strains. Enzymatic activity was manifested in the fraction with a molecular weight >30 kDa. *B. subtilis* 1719 metabolites had a higher activity, as evidenced by hydrolysis zones on milk (31.7±0.9 mm) and potato (27±0.6 mm) agars. The revealed properties of metabolites open the prospect for further research in order to develop new probiotic preparations.

Keywords

Bacillus subtilis 3H, *Bacillus subtilis* 1719, *B. subtilis* metabolites, metabiotics.

биоз) являются предрасполагающим фактором к развитию широкого спектра заболеваний [1,2]. Наиболее популярным методом коррекции дис-

биоза является применение пробиотиков на основе микробных клеток. Однако многолетний опыт использования данных препаратов показал, что их терапевтический эффект зачастую непредсказуем и зависит от индивидуальных особенностей макроорганизма [3,4]. В настоящее время перспективным направлением является разработка нового поколения пробиотических продуктов, получивших групповое название «метабиотики». Их основное отличие от традиционных пробиотиков – отсутствие в составе живых клеток микроорганизмов. Основу их терапевтического действия составляют инактивированные компоненты клеток, биоактивные вещества и сигнальные молекулы, продуцируемые в процессе выращивания пробиотических микроорганизмов, а также их синтетические аналоги. Благодаря своему составу данные препараты являются более эффективными и безопасными средствами коррекции дисбиоза, так как имеют охарактеризованный состав, не зависят от индивидуальных особенностей макроорганизмов, их легче дозировать и контролировать [5,6,7]. Внедрение метабиотиков в клиническую практику является относительно новым направлением. На фармацевтическом рынке подобных препаратов пока недостаточно. Известные и новые потенциальные пробиотические штаммы микроорганизмов могут стать перспективными продуцентами для создания метабиотиков направленного действия, поэтому изучение их метаболитов является актуальной задачей.

Среди большого разнообразия пробиотиков, применяемых в медицине, особое внимание привлекают препараты на основе *Bacillus subtilis*. Данные бактерии являются продуцентами широкого спектра различных биоактивных веществ, полезных для человека. Пробиотическое действие бацилл в первую очередь обусловлено высокой антагонистической активностью к широкому кругу патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также полиферментативными свойствами. По данным литературы, штаммы *B. subtilis* различаются между собой, так как продуцируют более 60 антибиотикоподобных соединений и ферментов, преимущественно класса гидролаз [8,9,10].

Ранее в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова) (Москва) выделены и охарактеризованы пробиотические штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, обладающие высокой антагонистической

активностью, а также выявлено цитотоксическое действие культуральных фильтратов на некоторые виды условно-патогенных микроорганизмов [11]. Исходя из этого представляет интерес изучить основные свойства метаболитов, продуцируемых данными бактериями.

Цель работы. Охарактеризовать противомикробные и ферментативные свойства метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* 3Н и *Bacillus subtilis* 1719.

Материалы и методы

В работе использовали пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* 3Н, *Bacillus subtilis* 1719 и тест-штаммы условно-патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Staphylococcus aureus* 29213, *Proteus mirabilis* 24a, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* 927 из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для получения метаболитов проводили периодическое глубинное культивирование бактерий *B. subtilis* на ранее подобранной питательной среде [11]. Клетки отделяли центрифугированием; супернатанты, содержащие метаболиты, стерилизовали при помощи мембранных фильтров с диаметром пор 0,22 мкм.

Противомикробную активность метаболитов изучали методом диффузии в агар. Для этого в чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона производили посев тест-штаммов в концентрации, соответствующей 0,5 степени по шкале Mc Farland. Далее в чашках проделывали лунки с диаметром 9 мм и добавляли по 100 мкл исследуемых метаболитов. Результаты оценивали через 18 часов инкубации при температуре 37°C по диаметру зон задержки роста тест-штаммов вокруг лунок.

Протеолитическую активность метаболитов оценивали по способности гидролизовать казеин. Для этого в чашках Петри с молочным агаром проделывали лунки с диаметром 9 мм и добавляли по 100 мкл исследуемых метаболитов. Через сутки инкубации при температуре 37°C оценивали результат по появлению прозрачных зон гидролиза вокруг лунок. Амилолитическую активность метаболитов оценивали по способности гидролизовать крахмал. Для этого в чашках Петри с картофельным агаром проделывали лунки с диаметром 9 мм и добавляли по 100 мкл исследуемых метаболитов. После инкубации в течение суток при температуре 37°C агар заливали раствором Люголя и оценивали результат по появлению светлых зон гидролиза вокруг лунок.

Для разделения исследуемых метаболитов на фракции с разной молекулярной массой ис-

пользовали центрифужные концентраторы с вставкой для ультрафильтрации на 30 и 5 кДа. Для осаждения белков к фильтрам добавления 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) с последующим центрифугированием со скоростью 3000 об/мин в течение 30 минут. Белковый состав метаболитов анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле по методу Лэммли. В качестве контроля использовали стерильную питательную среду.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Достоверность различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Результаты представляли средним арифметическим \pm ошибка репрезентативности ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

На первом этапе данного исследования представляло интерес изучить влияние метаболитов бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, секретируемых в питательную среду в процессе культивирования, на рост условно-патогенных микроорганизмов. Из представленных данных в таблице 1 видно, что исследуемые метаболиты обладали противомикробными свойствами, проявляющимися в задержке роста тест-штаммов. Метаболиты штамма *B. subtilis* 3Н оказались наиболее активными в отношении бактерий *S. aureus* FDA 209P и грибов *C. albicans* 927; метаболиты культуры *B. subtilis* 1719 в отношении *P. mirabilis* 24a. Достоверных различий в противомикробном действии исследуемых метаболитов на штамм *S. aureus* 29213 не выявлено ($p > 0,05$). Задержки роста тест-штамма *E. coli* ATCC 25922 при добавлении метаболитов *B. subtilis* 3Н, в отличие от метаболитов штамма *B. subtilis* 1719, не наблюдалось. Однако ранее нами зафиксировано цитотоксическое действие метаболитов *B. subtilis* 3Н в отношении данного тест-штамма [10].

В научной литературе охарактеризован ряд штаммов *B. subtilis*, противомикробное действие которых обусловлено синтезом литических ферментов [8]. Исходя из этого, на следующем этапе данного исследования проведена оценка влияния белкового компонента исследуемых метаболитов на проявление антагонистических свойств. К фильтрам, содержащим метаболиты, добавляли 10% раствор ТХУ, центрифугировали и удаляли осадок. Далее анализировали белковый состав методом электрофореза (рис. 1) и

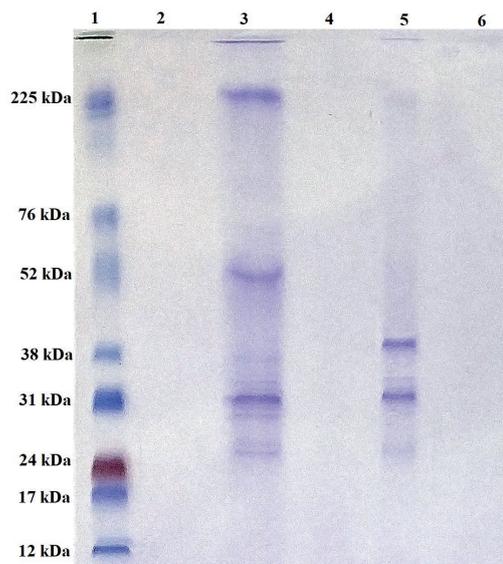


Рис. 1. Данные электрофореза метаболитов *B. subtilis*

Примечание. 1 – белковый маркер Cytiva RPN756E (12-225 kDa); 2 – стерильная питательная среда; 3 – нативные метаболиты *B. subtilis* 3Н; 4 – метаболиты *B. subtilis* 3Н после осаждения белка раствором ТХУ; 5 – нативные метаболиты *B. subtilis* 1719; 6 – метаболиты *B. subtilis* 1719 после осаждения белка раствором ТХУ.

противомикробную активность в сравнении с нативными метаболитами.

Из представленных данных на рисунке 1 видно, что в процессе культивирования исследуемые штаммы *B. subtilis* синтезируют вещества белковой структуры. В культуральном фильтрате *B. subtilis* 3Н выявлены белки массой 31, 52 и 225 кДа; *B. subtilis* 1719 – 31 и 38 кДа. При этом установлено, что данные вещества не влияют на проявление антагонистических свойств, о чём свидетельствует сохранение противомикробной активности метаболитов после осаждения белков раствором ТХУ и её отсутствие в белковом осадке. Разделение культуральных фильтратов, содержащих исследуемые метаболиты, по молекулярной массе при помощи центрифужных концентраторов показало, что антагонистическая активность проявляется во фракции < 5 кДа (табл. 1). Полученные данные демонстрируют наличие в составе метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 низкомолекулярных соединений, обладающих антагонистическими свойствами в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

При изучении ферментативной активности выявлены зоны гидролиза вокруг лунок с культуральными фильтрами *B. subtilis* на мо-

лочном и картофельном агаре, что свидетельствует о протеолитических и амилолитических свойствах исследуемых метаболитов. При этом установлено, что метаболиты *B. subtilis* 1719 проявили более высокую ферментативную активность по сравнению с метаболитами *B. subtilis* 3Н. Разделение культуральных фильтратов, содержащих исследуемые метаболиты, по молекулярной массе показало, что ферментативная активность проявляется во фракции >30 кДа (табл. 2).

Таким образом, полученные в данном исследовании результаты расширяют представления о функциональном потенциале штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 и вносят вклад в понимание механизмов их пробиотического действия. Выявленные свойства метаболитов обосновывают их дальнейшее исследование с целью разработки метаболитиков, а также изучение химического состава, способов выделения и очистки действующего вещества.

Выводы

1. Установлено, что в процессе глубинного культивирования бактерии *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 синтезируют в питательную среду штаммоспецифичные низкомолекулярные соединения (<5 кДа), обладающие противомикробными свойствами. Метаболиты *B. subtilis* 3Н наиболее активны в отношении бактерий *S. aureus* FDA 209P и *C. albicans* 927, о чём свидетельствовали диаметры зон задержки роста – 26±2,1 и 21,7±1,7 мм соответственно. Метаболиты *B. subtilis* 1719 наиболее активны в отношении тест-штамма *P. mirabilis* 24a (20,7±1,7 мм). В отношении бактерий *E. coli* ATCC 25922 у метаболитов *B. subtilis* 3Н активности не выявлено, в отличие от метаболитов *B. subtilis* 1719 (14±1,1 мм).
2. Установлено, что штамм *B. subtilis* 3Н синтезирует белки с молекулярной массой 31, 52 и 225 кДа, штамм *B. subtilis* 1719 – 31 и 38 кДа.

Таблица 1. Противомикробная активность метаболитов *B. subtilis*

Тест-штаммы	Диаметры зон задержки роста тест-штаммов при добавлении метаболитов <i>B. subtilis</i> 3Н, мм (M±m)					
	Нативные метаболиты	После осаждения белка	Осадок (белок)	>30 кДа	<30 кДа, но >5 кДа	<5 кДа
<i>S. aureus</i> FDA 209P	26±2,1	25,3±2,8	0	0	0	24,3±2,3
<i>S. aureus</i> 29213	21,7±3,2	20,7±2,4	0	0	0	20±2,1
<i>P. mirabilis</i> 24a	15,3±2,2	15,3±2	0	0	0	14,7±1,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> 927	21,7±1,7	21±1,7	0	0	0	20,7±1,9
Тест-штаммы	Диаметры зон задержки роста тест-штаммов при добавлении метаболитов <i>B. subtilis</i> 1719, мм (M±m)					
	Нативные метаболиты	После осаждения белка	Осадок (белок)	>30 кДа	<30 кДа, но >5 кДа	<5 кДа
<i>S. aureus</i> FDA 209P	20,7±1,7*	20±2,5	0	0	0	20±2,1
<i>S. aureus</i> 29213	18±2,1	17,7±1,9	0	0	0	18,3±1,5
<i>P. mirabilis</i> 24a	20,7±1,7*	20±3,1	0	0	0	19±1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	14±1,1*	13,3±0,9	0	0	0	11±0,6
<i>C. albicans</i> 927	17±1,5*	17,3±1,2	0	0	0	16,7±2,6

Примечание. * p<0,05 по сравнению с активностью метаболитов *B. subtilis* 3Н.

Таблица 2. Ферментативная активность метаболитов *B. subtilis*

Фракции	Зоны гидролиза казеина, мм (M±m)		Зоны гидролиза крахмала, мм (M±m)	
	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719	<i>B. subtilis</i> 3Н	<i>B. subtilis</i> 1719
Нативные	29±1	31,7±0,9*	23,7±0,9	27±0,6*
>30 кДа	32,3±1,5	34±1,2	28,3±1,8	30,7±1,5
<30 кДа, но >5 кДа	0	0	0	0
<5 кДа	0	0	0	0

Примечание. * p<0,05 по сравнению с активностью метаболитов *B. subtilis* 3Н.

При этом данные вещества не проявляли противомикробных свойств.

3. Выявлены протеолитические и амилолитические свойства исследуемых метаболитов. При этом штамм *B. subtilis* 1719 обладал более высокой активностью, о чём свидетельствовали

зоны гидролиза на молочном и картофельном агаре с диаметрами $31,7 \pm 0,9$ мм и $27 \pm 0,6$ мм соответственно. Ферментативное действие отмечалось во фракции >30 кДа, что указывает на наличие протеолитических и амилолитических ферментов в составе метаболитов.

Литература

1. Hou K, Wu ZX, Chen XY, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7(1):135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4.
2. Lee JY, Tsois RM, Bäumlér AJ. The microbiome and gut homeostasis. *Science.* 2022;377(6601):eabp9960. DOI: 10.1126/science.abp9960
3. Михайлова НА, Воеводин ДА, Лазарев СА. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020; 4:346-355. DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-4-7.
4. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell.* 2018; 174(6):1388-1405. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.041.
5. Shenderov BA, Sinita AV, Zakharchenko MM, et al. *Metabiotics: Present state, challenges and perspectives.* Springer International Publishing. 2020; 123 P. DOI: 10.1007/978-3-030-34167-1
6. Kapoor B, Singh A, Gulati M, et al. *Orchestration of Obesolytic Activity of Microbiome: Metabiotics at Centre Stage.* *Curr Drug Metab.* 2022;23(2):90-98. DOI: 10.2174/1389200223666220211095024
7. Sadeghi A, Ebrahimi M, Kharazmi MS, et al. Effects of microbial-derived biotics (meta/pharma/post-biotics) on the modulation of gut microbiome and metabolome; general aspects and emerging trends. *Food Chem.* 2023; 411:135478. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.135478
8. Sorokulova I. Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics. *Prob. Health.* 2013; 1(4):1-5.
9. Iqbal S, Begum F, Rabaan AA, et al. Classification and Multifaceted Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus subtilis* Group: A Comprehensive Review. *Molecules.* 2023;28(3):927. DOI: 10.3390/molecules28030927
10. Jiang S, Hu JY, Cheng HW. The Impact of Probiotic *Bacillus subtilis* on Injurious Behavior in Laying Hens. *Animals (Basel).* 2022; 12(7):870. DOI: 10.3390/ani12070870
11. Лазарев СА, Арзуманян ВГ, Михайлова НА. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis*. *Бактериология.* 2021; 6(2): 38-42. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-38-42

Сведения об авторах

Лазарев Сергей Александрович – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва. E-mail: lazarevsr1@gmail.com. ORCID: 0000-0003-3206-6015.
Михайлова Наталья Александровна – доктор медицинских наук, профессор, зав. лабораторией протективных антигенов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва. ORCID: 0000-0002-6652-2093.

Поступила 31.07.2023.