

УДК: 633.88:613.3:612.015.1

## **Поиск пробиотической культуры *Bacillus subtilis* на биомассе лекарственных трав с помощью фагоидентификации**

Рыльский А. Ф., Каменова О. П., Крупей К. С.

На биомассе лекарственных растений (мята, ромашка, расторопша) с помощью метода фагоидентификации выявлена культура *Bacillus subtilis*, в которой могут быть пробиотические штаммы. Сделано предположение, что лекарственные травы обладают полезными свойствами не только из-за комплекса биологически активных веществ, но и благодаря содержанию в их отварах сенной палочки, усиливающей лечебный эффект.

Ключевые слова: фагоидентификация, пробиотическая культура *Bacillus subtilis*, отвары лекарственных трав

## **The search of probiotic culture of *Bacillus subtilis* on medicinal herbs' biomass using the phages**

Rylsky A. F., Kamenova O. P., Krupey K. S.

The culture of *Bacillus subtilis* which can include probiotic strains was identified on the biomass of herbs (mint, camomile, milk thistle) using specific bacteriophage. The authors suggest that medicinal herbs possess useful properties not only because of the biologically active substances, but also due to the content of enhancing therapeutic effect *Bacillus subtilis* in their decoction.

Keywords: phage identification, probiotic culture of *Bacillus subtilis*, medicinal herbs' decoctions

### **Введение**

В последнее время бактерии *Bacillus subtilis* привлекают внимание исследователей как один из перспективных микроорганизмов для производства пробиотических препаратов. Способность различных штаммов данной бактериальной культуры синтезировать широкий спектр биологически активных веществ создала основу для ее широкого использования [5].

Общепринято считать, что пробиотики — препараты и продукты питания, содержащие в составе живые микроорганизмы, которые являются представителями нормальной микрофлоры человека и при применении в адекватных количествах улучшают здоровье хозяина [3].

Известно, что некоторые штаммы *B. subtilis* способны продуцировать интерферон 2- $\alpha$ -лейкоцитарный человеческий. В организме человека этот тип интерферона продуцируется лейкоцитами и лимфобластами при вирусной инфекции или в ответ на индукцию синтетическими полирибонуклеотидами. Являясь фактором неспецифической резистентности организма, он играет контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза, и обладает антипролиферативной активностью, антитоксическим действием, а также противовирусным, антитуморогенным, антимуtagenным и радиопротективным эффектами [6].

Микроорганизмы являются постоянными спутниками не только человека и животных, но и высших растений, в том числе и тех, которые используются как лекарственное сырье. Они поселяются и ведут активный образ жизни, как на поверхности, так и внутри зеленых частей растений, их корней, семян, плодов [1].

На листовых пластинках и стеблях злаковых растений практически всегда находятся споры сенной палочки. Системные исследования по поиску пробиотических культур на биомассе лекарственных растений ранее не проводились. Исходя из этого, мы предполагаем, что полезные свойства лекарственных трав обусловлены не только комплексом биологически активных веществ, но и содержащейся на лекарственном сырье пробиотической бактериальной культурой, которая усиливает лечебный эффект.

### **Цель исследования**

Целью нашей работы был поиск бактериальной культуры *B. subtilis* с возможными пробиотическими свойствами на биомассе лекарственных трав с помощью фагоидентификации.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования служило сухое растительное лекарственное сырье, предлагаемое в аптечной сети Украины, семейства Астровые (*Asteraceae*) — ромашка лекарственная (*Matricaria recutita*), расторопша пятнистая (*Silybum marianum*) и Яснотковые (*Lamiaceae*) — мята (*Mentha flores*). В качестве контроля использовали солому и сено, собранные в Запорожской области.

Травы измельчали в ступке до размера частиц 1—2 мм. Далее готовили их отвары. Для этого 5 стеклянных колб Эрленмейера вместимостью 750 см<sup>3</sup> наполняли 500 мл водопроводной воды и автоклавировали. Затем в колбы вносили по 2 г каждого образца сырья и кипятили в течение 10 минут с ватно-марлевыми пробками. После охлаждения отваров до комнатной температуры проводили измерения следующих физико-химических показателей: водородный показатель (рН), окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), температура. Для измерения использовали рН/ОВП-метр-103. Оптическую плотность отваров определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм. Культивирование проводили при 29 °С.

На пятые сутки из каждой колбы засевали по 0,3 мл отвара на чашки Петри методом В. Дригальского. Посев культуры проводили в трёх повторах. Питательной средой служил мясопептонный агар (МПА). В первые сутки после посева проводили измерения показателей ОВП и рН. На третьи сутки культивирования делали мазки, окрашивая по Грамму. Аналогичные опыты проводили на пятые, десятые и четырнадцатые сутки.

Грамположительные палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно и попарно, подвергали фагоидентификации [2, 4].

Выросшие колонии пересевали на МПБ и инкубировали термостате в течение 18 часов при температуре 37 °С. Затем наносили 3—4 капли бульонной культуры на поверхность МПА на чашки Петри. Культуру распределяли шпателем по всей площади чашки, затем высушивали 20 минут в термостате. В одну из них наносили каплю фага Bs-13 УГСХА, во вторую — фаг Bs-16 УГСХА. Третья чашка с нанесенной культурой (без фагов) служила контролем. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 20 минут, и на 18 часов помещали в термостат при 37 °С. Эксперимент проводили в трёх повторах.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него. Отсутствие лизиса на газоне роста исследуемой культуры считали отрицательным результатом. При положительном результате культуру относили к виду *B. subtilis*.

## Результаты и обсуждения

Результаты наших исследований показали, что в отварах из сена, ромашки и расторопши наблюдалось повышение показателя ОВП на пятые (сено — 128,3 мВ, ромашка — 104,8 мВ, расторопша — 112 мВ) и постепенное снижение в последующие дни. На четырнадцатые отвар из ромашки обладал наиболее низ-

ким показателем и составил — 238 мВ (см. табл. 1). В отваре из соломы значения ОВП увеличивались в течение десяти суток (122,3 — 180,1 мВ), а на четырнадцатые сутки показатели резко снижались (107,6 мВ). В отваре из мяты величина значений изменялась скачкообразно. На пятые сутки наблюдался рост показателей (120,9 мВ), затем резкий спад значений на десятые сутки (63,5 мВ), после чего на четырнадцатые сутки рост показателя восстанавливался (83,3 мВ).

Таблица 1 — Изменение некоторых физико-химических показателей отваров лекарственных трав (на 5-е, 10-е, 14-е сутки)

Показатели	Сутки	Сено	Солома	Мята	Ромашка	Расторопша
ОВП, мВ	1	101,1	122,3	35,5	79,6	69,3
	5	128,3	146,5	120,9	104,8	112
	10	109,3	180,1	63,5	-235	83,7
	14	80,9	107,6	83,3	-238	7,1
рН	1	7,72	8,58	7,9	7,66	8,25
	5	6,97	7,36	7,34	6,24	6,96
	10	7,41	8,27	7,8	7,06	7,4
	14	7,65	8,28	8,11	7,4	7,56
Оптическая плотность, ед. опт. пл.	1	0,12	0,075	0,4	0,12	0,44
	5	0,26	0,1	0,42	0,2	0,48
	10	0,39	0,16	0,79	0,6	0,72
	14	0,36	0,15	0,8	0,37	0,58
t, °С	1	24,3	25,4	26	29,2	31,5
	5	20,5	20,7	20,6	19,7	19,3
	10	20,1	21,2	20,9	20,1	20,2
	14	22,8	23,6	23,5	23,2	22,5

Отвары всех исследуемых трав имели наибольший рН на первые сутки, затем на пятые сутки водородный показатель снижался, после чего значения рН снова возрастали. Диапазон значений рН варьировал в пределах: для ромашки от 6,24 до 7,66; для сена диапазон составил 6,97 — 7,72; мяты — от 7,34 до 7,9, а для расторопши наблюдался интервал 6,96 — 8,25. В течение десяти суток во всех отварах было отмечено увеличение оптической плотности с последующим снижением.

Наибольший рост бактериальных культур наблюдался в отваре из мяты (единицы оптической плотности составили от 0,4 до 0,8). В других отварах максимальные показатели оптической плотности составили: в расторопше — 0,72, ромашке — 0,6, сене — 0,39 ед. опт. пл. Самая меньшая оптическая плотность прослеживалась в отваре из соломы (0,39 ед. опт. пл.).

На пятые сутки исследований во всех мазках, взятых из каждой колбы, присутствовали споры бактериальных культур — грамположительные палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно или попарно, что позволило нам сделать предположение о наличии в исследуемых отварах культуры *B. subtilis*. Для подтверждения этой гипотезы мы провели фагоидентификацию с помощью фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которая является экспресс-методом определения сенной палочки (время исследований занимает 25 часов). Эффективность этого метода была подтверждена ранее российскими исследователями [4].

## Выводы

Полученные нами результаты подтверждают присутствие *B. subtilis* на поверхности всех лекарственных трав. Следовательно, при лечении отварами этих трав человек употребляет совместно с комплексом биологически активных веществ, споры и вегетативные клетки сенной палочки, т. е. всегда присутствует второй лечебный фактор — влияние пробиотической культуры *B. subtilis* на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта, отвечающий за иммунологический статус организма.

## Литература

1. Бородина И. Б., Мануйлов И. М. Микрофлора семян лекарственных растений // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. — 2011. — Т. 83. — № 9. — С. 43—47.
2. Габрилович И. М. Общая характеристика бактериофагов // Основы бактериофагии. — Минск, 1973. — С. 5—24.
3. Можнина Т. Л. Роль и место пробиотических препаратов в современной медицине (по материалам руководства Probiotics and prebiotics, 2008) // Сучасна гастроентерологія. — 2009. — Т. 45. — № 1 — С. 5—13.
4. Пирюшова А. Н., Журавкова Ю. А., Феоктистова Н. А., Васильев Д. А. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* // Материалы V Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум» URL: <http://www.scienceforum.ru/2014/645/2964>
5. Похиленко В. Д., Перельгин В. В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность, 2007. — Т. 32—33. — № 2—3. — С. 20—41.
6. Свойства бактерий: *Bacillus subtilis* штамм ВКПМ В 7048, *Bacillus licheniformis* штамм ВКПМ В 7038, *Bacillus subtilis* штамм ВКПМ В 7092 // Портал «Ветом». Все о препарате НПФ «Исследовательский центр». — Режим доступа:

[http://www.portalvetom.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54&Itemid=11](http://www.portalvetom.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=11)

## Literature

1. Borodina I. B., Manujlov I. M. Mikroflora semyan lekarstvennyx rastenij // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2011. — T. 83. — № 9. — S. 43—47.
2. Gabrilovich I. M. Obshhaya xarakteristika bakteriofagov // Osnovy bakteriofagii. — Minsk, 1973. — S. 5—24.
3. Mozhnina T.L. Rol' i mesto probioticheskix preparatov v sovremennoj medicine (po materialam rukovodstva Probiotics and prebiotics, 2008) // Suchasna gastroenterologiya. — 2009. — T. 45. — № 1. — S. 5—13.
4. Piryushova A. N., Zhuravkova Yu. A., Feoktistova N. A., Vasil'ev D. A. Fagoidentifikaciya bakterij *Bacillus subtilis* // Materialy V Mezhdunarodnoj studencheskoj e'lektronnoj nauchnoj konferencii «Studencheskij nauchnyj forum» URL: <http://www.scienceforum.ru/2014/645/2964>
5. Poxilenko V. D., Perelygin V. V. Probiotiki na osnove spoorobrazuyushhix bakterij i ix bezopasnost' // Ximicheskaya i biologicheskaya bezopasnost', 2007. — T. 32—33. — № 2—3. — S. 20—41.
6. Svoystva bakterij: *Bacillus subtilis* shtamm VKPM B 7048, *Bacillus licheniformis* shtamm VKPM B 7038, *Bacillus subtilis* shtamm VKPM B 7092 // Portal «Vetom». Vsye o preparate NPF «Issledovatel'skij centr». — Rezhym dostupa: [http://www.portalvetom.ru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=54&Itemid=11](http://www.portalvetom.ru/index.php?option=com_content&view=article&id=54&Itemid=11)