5. Анализ системных ВПР конечностей и популяционных частот в г. Минске за 2018-2020 гг. показал, что среди живорожденных, мертворожденных и плодов, абортированных по генетическим показаниям, данный порок составил ежегодно в среднем 2,67 случаев со средней популяционной частотой 0,12 ‰.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершова-Павлова, А. А. Эффективность пренатальной диагностики и ее вклад в популяционные частоты врожденных пороков развития центральной нервной системы в Беларуси / А. А. Ершова-Павлова, И. В. Наумчик // Медицинские новости. - 2018. - №4. – С. 27

2. Заварухин, В. И. Эмбриогенез верхней конечности: от бугорка до сложнейшего механизма / В. И. Заварухин // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2018. - № 4. – С. 61- 67.

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕКОТОРЫМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА *IN VITRO*

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* IN RELATION TO SOME REPRESENTATIVES OF THE OPPORTUNISTIC MICROFLORA OF THE GASTROINTESTINAL TRACT *IN VITRO*

С. Г. Давлатов, Е. Р. Грицкевич, Ю. В. Жильцова

S. G. Davlatov, E. R. Gritskevich, Y. V. Zhyltsova

Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: siyovushdavlatov4567@gmail.com

International Sakharov Environmental Institute of the Belarusian State University
Minsk, Republic of Belarus

Выявлен антагонистический потенциал штаммов бактерий рода Bacillus в отношении некоторых представителей условно-патогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (E. coli K-12, E. coli, E. coli ATCC 25922, Pr. mirabilis, Pr. Vulgaris). Установлено, что наиболее перспективным пробиотическим препаратом из исследованных («Ветома 1.1», «Фитоспорин», «Энтерожермина») является препарат «Энтерожермина», в состав которого входят штаммы бактерий B. clausii: наблюдался высокий уровень антагонистической активности по отношению к Pr. vulgaris (ЗЗР 9,4 ± 0,3 мм) и E. coli (ЗЗР 8,2± 0,4 мм).

The antagonistic potential of bacterial strains of the genus Bacillus has been revealed against some representatives of the opportunistic microflora of the gastrointestinal tract (E. coli K-12, E. coli, E. coli ATCC 25922, Pr. mirabilis, Pr. Vulgaris). It was found that the most promising probiotic drug among the studied (Vetoma 1.1, Phytosporin, Enterogermina) is Enterogermina, which includes strains of B. clausii bacteria: a high level of antagonistic activity was observed in relation to Pr. vulgaris (ZZR 9.4 ± 0.3 mm) and E. coli (ZZR 8.2± 0.4 mm).

Ключевые слова: антагонистическая активность, бактерий рода Bacillus, пробиотические препараты, штаммы, спорообразующие бактерии, условно-патогенная микрофлора ЖКТ in vitro.

Keywords: antagonistic activity of bacteria of the genus Bacillus, probiotic drugs, strains, spore-forming bacteria, conditionally pathogenic microflora of the gastrointestinal tract in vitro.

https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-177-180

Бактерии рода *Bacillus* обычно присутствуют в кишечнике человека и не проявляют патогенной активности, что является предпосылкой их использования в качестве фармацевтических препаратов, пищевых добавок и пробиотических продуктов. Действенность пробиотических препаратов зависит, в первую очередь, от степени проявления ими антагонистической активности в отношении тех или иных представителей условно-патогенных микробных сообществ желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Поэтому *целью* нашей работы являлось проанализировать антагонистическую активность бактерий рода *Bacillus* по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры ЖКТ *in vitro*. В связи с чем решались следующие задачи: 1). Самостоятельно выделить и идентифицировать бактерии рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических и микробиологических препаратов. 2). Провести анализ антагонистической активности бактерий вида *Bacillus subtilis* ВКПМ B-10641 (*B. subtilis*), выделенных из пробиотического препарата «Ветома 1.1» по отношению к некоторым представителям

ЖКТ *in vitro*. 3). Провести анализ антагонистической активности бактерий вида *B. subtilis* (штамм 26 Д) выделенных из микробиологического препарата «Фитоспорин» по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры ЖКТ *in vitro*. 4). Провести анализ антагонистической активности бактерий вида *Bacillus clausii* (*B. clausii*) выделенных из пробиотического препарата «Энтерожермина» по отношению к некоторым представителям условно-патогенной микрофлоры ЖКТ *in vitro*.

Объектами исследования являлись бактерии B. subtilis, выделенные из препаратов «Фитоспорин» и «Ветом 1.1», и B. clausii, выделенные из препарата «Энтерожермина». В качестве штаммов бактерий условно-патогенной микрофлоры были использованы E. coli K-12, E. coli, E. coli ATCC 25922, Pr. mirabilis, Pr. vulgaris, предоставленные НИЛ молекулярной генетики и биотехнологий кафедры генетики биологического факультета БГУ Белорусского государственного университета.

Используемые пробиотические препараты и их состав:

Препарат «Ветом 1.1» (рисунок 1) – пробиотик широкого спектра действия, который используется в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных, домашних животных и птиц, с целью нормализации микрофлоры кишечника, в том числе для повышения устойчивости организма к патогенам. Представляет собой порошок белого цвета, мелкодисперсный, без запаха, растворимый в воде, с образованием осадка белого цвета. Данный препарат содержит сухую бакмассу живых спорообразующих бактерий B. subtilis штамм ВКПМ B-10641.

Рисунок 1 – Пробиотический препарат «Ветом 1.1»

Препарат «Фитоспорин» (рисунок 2) – микробиологический препарат нового поколения, эффективный против грибных и бактериальных болезней на любых культурах - домашних цветах, укореняемых черенках, в саду на плодовых деревьях и кустарниках, на всех овощных культурах. Главным действующим компонентом является естественный биофунгицид, то есть в нем могут содержаться споры и клетки живых бактерий естественного происхождения B. subtilis 26 Д. Проиводитель: «БашИнком», Россия.

Рисунок 2 – Пробиотический препарат «Фитоспорин»

Пробиотический препарат «Энтерожермина» (рисунок 7) представляет собой суспензию спор B. clausii, которые обычно присутствуют в кишечнике и не проявляют патогенной активности. Благодаря действию B clausii препарат восстанавливает кишечную микрофлору, нарушенную в результате лечения лекарственными средствами, которые приводят к дисбактериозу. Производитель: «Sanofi-Aventis Groupe», Франция.

Рисунок 3 – Пробиотический препарат «Энтерожермина»

Приготовление питательной среды для спорообразующих бактерий:

Для выделения спорообразующих бактерий B.subtilis и B.clausii использовали питательную среду в виде МПА.

Эту питательную среду готовили по следующему алгоритму: брали мясо-пептонный агар массой 3,22 гр, который растворяли в 100 мл дистиллированной воды, затем смесь варили на водяной бане в течение 30 минут. Затем готовую среду слегка охлаждают и разливают в чашки Петри. Далее чашку маркировали (на крышке маркером указывали дату, название питательной среды и фамилию) и помещали вверх дном в инкубатор-термостат. Инкубацию проводили в термостате при 37 ° С в течение 48 часов.

Микробиологическую посуду (колбы, пробирки, чашки Петри) стерилизовали сухим теплом (горячим воздухом) в сушильных шкафах, используя следующий режим: 160° – 180°С в течение 2 часов.

Прокаливанием в пламени стерилизовали металлические и стеклянные предметы – иглы, петли, предметные и покровные стекла, горлышки колб, бутылок, пробирок [3].

Посев колоний на питательные среды:

Из разведения 1:100000; 1:1000000 были сделаны посевы шпателем в чашки Петри. Материал предварительно наносят на поверхность питательной среды возле края чашки петлей или пипеткой. Стерильный шпатель проносят через пламя, охлаждают, касаясь стенки чашки, держа чашку полузакрытой, распределяют материал равномерно по поверхности среды. Внесли в чашку 0,5 мл колонии. Поместили чашки Петри в термостат на 24 часа при температуре 37±0,5˚С. Через 24 часа провели морфологическую оценку колоний.

Выделение чистой культуры B.subtilis и B.clausii из пробиотических препаратов:

Для выделения культуры B.subtilis из препаратов «Ветом 1.1» и «Фитоспорин», мы смешали представленные препараты с 2 мл стерильной воды в эппендорфах, затем взбивали используя лабораторный вортекс [4].

Далее во все чашки Петри с МПА раскапывали растворенные в стерильной воде пробиотические препараты по 100 мкл, равномерно распределяя материал по поверхности питательной среды стеклянным шпателем. Стерильный шпатель предварительно проносился через пламя, охлаждая, касаясь стенки чашки, держа чашку полузакрытой. Затем поставили в термостат при температуре 37 °С в течение 24-48 ч.

Препарат «Энтерожермина», который содержит в своем составе B. clausii раскапывали по 100 мкл на мясопептонный агар, равномерно распределяя его по поверхности питательной среды стеклянным шпателем. Стерильный шпатель предварительно проведя над пламенем, охлаждая, касаясь стенки чашки, держа чашку полузакрытой. Затем поставили в термостат при температуре 37 °С в течение 24-48 ч.

Культивирование на поверхности среды в чашках Петри проводили с помощью бактериологической петли. При посеве клетки микроорганизмов отбирали из среды стерильной петлей и, открыв крышку чашки Петри, небольшими движениями наносили штрихи на поверхность среды, после чего чашку закрывали и помещали в термостат с опущенной крышкой при температуре 36-37° С на 24 часа.

Приготовление среды Эндо: Смешать 51,0 г порошка с 980 мл дистиллированной воды. Кипятить, пока частицы полностью не растворятся. Охладить до 45°С и асептически добавить 20 мл 95% этанола. Смешать и налить по 4 мл в чашки Петри диаметром 60 мм [5].

Анализ антагонистической активности методом агаровых блоков: В этой части исследования мы исследовали антагонистическую активность спорообразующих бактерий, выделенных из трех препаратов, по отношению к некоторым представителям энтеробактерий. Этот анализ проводился с использованием метода агаровых блоков.

Метод агаровых блоков удобен тем, что выращивание штаммов-антагонистов и тест-культур производится на разных питательных средах.

В качестве тестовых культур использовали следующие условно-патогенные микроорганизмы, предоставленные НИЛ молекулярной генетики и биотехнологий кафедры генетики биологического факультета БГУ: E. coli , E. coli K-12, E. coli ATCC 25922, Pr. mirabilis и Pr. vulgaris, St. aureus.

Изучаемые на антагонистическую активность микроорганизмы засевали на поверхность агаризованной среды в чашке Петри таким образом, чтобы в процессе его роста сформировался «сплошной газон».

После того, как клетки микроорганизма хорошо выросли, стерильным пробочным сверлом (или пробиркой) вырезали агаровые блоки, которые перенесли на предварительно засеянную тест-культурой поверхность среды в другой чашке Петри (рисунок 4).

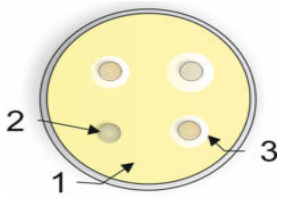

Рисунок 4 – Определение антагонистической активности методом агаровых блоков (1 -тест-культура, 2-агаровый блок, 3-зона задержки роста тест-культуры)

Тест-культуру засевали шпателем, а агаровые блоки накладывали ростом вверх на равном расстоянии один от другого и от краев чашки, плотно прижимая к агаровой пластинке. На одной чашке Петри размещали по 2 агаровых блоков с различными штаммами бактерий рода Bacillus [2].

Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 24 часов. Результаты были просмотрены через 48 часов.В случае чувствительности последнего к антибактериальному веществу продуцента зоны роста

вокруг агаровых блоков не образовывались. Чем больше выделяется антибактериального вещества, тем оно активнее и чем лучше диффундирует в среде, тем больше диаметр зоны задержки роста тест-культуры. Нечувствительные к антибиотическому веществу этого продуцента, клетки растут по всей поверхности среды. Уровень антагонизм бактерий рода Bacillus определяли по зоне задержки роста (ЗЗР) условно-патогенных микроорганизмов при совместном культивировании бактерий в условиях оптимальных для роста тестовых культур [1]. Обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel. В связи с этим данные в таблицах представлены в виде среднего значения и соответствующего стандартного отклонения (M ± σ). Средние значения и стандартные отклонения рассчитывались по формулам:

$$M_{cз} = \frac{m_1 + m_2 + m_3}{3} \quad (1)$$

где Mсз – рассчитанное среднее, m1, m2, m3 – значения, полученные в каждой из повторностей;

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(m_i - m_{cз})^2}{n-1}} \quad (2)$$

где σ – стандартное отклонение, mi – значение, полученное в отдельной повторности, mсз– среднее значение , n – число повторностей.

Статистический анализ данных проводился с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0.

Таким образом, антагонистическая активность бактерий B. subtilis ВКПМ B-10641, выделенных из пробиотического препарата «Ветом 1.1», со временем увеличивалась при совместном культивировании с некоторыми представителями условно-патогенной микрофлоры ЖКТ in vitro на 1, 3 и 5-е сутки (исключение E. coli K-12). Наибольшее подавляющее действие B. subtilis ВКПМ B-10641 отмечалось по отношению к энтеробактериям E. coli, E. coli ATCC 25922 на 5-е сутки совместного культивирования, однако отсутствие данного действия наблюдалось по отношению к E. coli K-12 (зона задержки роста (ЗЗР) 1,5±0,1 мм). B. subtilis ВКПМ B-1064, выделенный из пробиотического препарата, проявил высокую антагонистическую активность по отношению к Pr. vulgaris (ЗЗР 10,3±0,3 мм). При исследовании антагонистической активности бактерий B. subtilis 26 Д, выделенных из микробиологического препарата «Фитоспорин», было отмечено, что данный штамм проявил более низкую антагонистическую активность среди рассматриваемых спорообразующих бактерий. Бактерии B. subtilis 26 Д проявляли антагонистическую активность по отношению к Pr. vulgaris (ЗЗР 6,3 ± 0,2 мм) и Pr.mirabilis (5,3 ±0,1 мм) на 5-е сутки совместного культивирования. Бактерии B. clausii, выделенные из пробиотического препарата «Энтерожермина» проявляли высокий уровень антагонистической активности по отношению к Pr. vulgaris (ЗЗР 9,4 ± 0,3 мм) и E. coli (ЗЗР 8,2± 0,4 мм) на 5-е сутки совместного культивирования. Наименьшая степень антагонистической активности B. clausii наблюдалась по отношению к E. coli ATCC 25922 (ЗЗР 3± 0,1 мм). На основании проделанной работы установлено, что более перспективным пробиотическим препаратом из представленных спорообразующих является препарат «Энтерожермина», в состав которого входят штаммы бактерий B. clausii.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleshkin, V.A. History, present situation, and prospects of probiotic research conducted in the G. N. Gabrichevsky Institute for Epidemiology and Microbiology / V. A. Aleshkin [et al.] // Microbial ecology in Health and Disease. – 2016. – V. 20. – P. 113-114.

2. Almada, C. N. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts / C. N. de Almada [et al.] // Appl Microbiol Biotechnol. – 2015. – P. 1-25.

3. Atkinson, S. Quorum sensing and the lifestyle of Yersinia / S. Atkinson [et al.] // Curr Issues Molecular Biology.– 2018. –V. 1. –P. 1-2.

4. Auger, S. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the Bacillus cereus group / S. Auger, N. Ramarao, C. Faille // Environ. Microbiol. – 2013. – V. 10. – 1128 p.

5. Corthesy, B. Cross-Talk between probiotic bacteria and the host immune system / B. Corthesy [et al.] // Journal of Nutrition. – 2019. – V. 137. – P. 781-782.

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ВОЗДУХА НА БОЛЕЗНИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

THE IMPACT OF AIR POLLUTION ON RESPIRATORY DISEASES

Е. Д. Милашевская, Д. С. Ляшук, В. О. Лукашевич, С. Н. Чигирь

Y. D. Milasheuskaya, D. S. Lyashuk, V. O. Lukashevich, S. N. Chigir

Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
o5lizka@gmail.com

International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus