



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005111301/13, 19.04.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.04.2005

(43) Дата публикации заявки: 27.10.2006

(45) Опубликовано: 27.04.2007 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2208633 C1, 20.07.2003. RU 2112035
C1, 27.05.1998. RU 2184774 C1, 10.07.2002. RU
2169767 C1, 27.06.2001. МАЛИК Е.В. и др.
Изучение ферментативной активности штаммов
Bacillus subtilis. Пробиотик, пребиотики,
синбиотики и функциональные продукты питания.
Современное состояние и перспективы. Сборник
материалов международной конференции. М.: 2-4
июня, 2004, с.143-144.

Адрес для переписки:

105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, ГУ
НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, директору
Б.Ф. Семенову

(72) Автор(ы):

Михайлова Наталья Александровна (RU),
Гатауллин Айрат Гафуанович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное учреждение Научно-
исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова Российской академии
медицинских наук (ГУ НИИВС им. И.И.
Мечникова РАМН) (RU)

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* 1719-ПРОДУЦЕНТ АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНОЙ
БИОМАССЫ В ОТНОШЕНИИ БОЛЕЗНЕТВОРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, А ТАКЖЕ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ, АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ И ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, может
быть использовано при создании пробиотиков.
Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 выделен в
естественных условиях в микробиологической
лаборатории ГУ НИИВС им. И.И.Мечникова РАМН.

Штамм проявляет широкий спектр
антагонистической активности, низкую адгезивную
активность, иммуномодулирующую активность,
продуцирует комплекс гидролитических
ферментов. 6 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 298 032** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2005111301/13, 19.04.2005**

(24) Effective date for property rights: **19.04.2005**

(43) Application published: **27.10.2006**

(45) Date of publication: **27.04.2007 Bull. 12**

Mail address:

**105064, Moskva, M. Kazennyj per., 5a, GU
NIIVS im. I.I. Mechnikova RAMN, direktoru
B.F. Semenovu**

(72) Inventor(s):

**Mikhajlova Natal'ja Aleksandrovna (RU),
Gataullin Ajrat Gafuanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchno-
issledovatel'skij institut vaktsin i
syvorotok im. I.I. Mechnikova Rossijskoj
akademii meditsinskikh nauk (GU NIIVS im.
I.I. Mechnikova RAMN) (RU)**

(54) **Bacillus subtilis 1719 BACTERIUM STRAIN AS PRODUCER OF ANTAGONISTICALLY ACTIVE BIOMASS IN RELATES TO PATHOGENIC MICROORGANISMS, AS WELL AS PROTEOLYTIC, AMYLOLYTIC, AND LIPOLYTIC ENZYMES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to *Bacillus subtilis* 1719 bacterium strain isolated under natural conditions in microbiological laboratory.

EFFECT: strain of wide spectrum of antagonistic activity, low adhesive activity, immunomodulating activity and producing complex of hydrolytic enzymes.

6 tbl, 1 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к получению биологически активных веществ, оказывающих антагонистическое влияние на условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, а также к получению ферментных препаратов.

Известен штамм бактерий *Bacillus subtilis* P-1 - один из наиболее сильных
5 продуцентов протеазы (RU 2208633. C12N 1/20, 2001 г.).

Недостатком этого штамма является длительность процесса культивирования и необходимость его выращивания на дорогостоящих питательных средах, включающих нестандартные пищевые компоненты.

Задачей предлагаемого изобретения является получение нового штамма - продуцента
10 антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилалитических и липолитических ферментов на простых питательных средах.

Для решения указанной задачи предлагается штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719, депонированный Коллекцией Государственного научно-исследовательского института
15 стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича под номером 277.

Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 выделен в естественных условиях в микробиологической лаборатории ГУ НИИВС им. И.И.Мечникова РАМН.

Культурально-морфологические и другие свойства штамма. Клетки штамма - крупные
20 грамположительные аэробные палочки с центрально расположенными цилиндрическими эндоспорами, могут возникать скопления клеток в виде цепочек. При изучении колоний штамма в косопроходящем свете обнаружено, что колонии зернистые с выступающим плотным центром, края неровные. При микроскопии обнаружено, что клетки представляют собой крупные, бочкообразные палочки, соединенные в цепочки. В зависимости от условий
25 культивирования и питательной среды колонии могут образовывать пигмент от бежевого до розового. Штамм обладал низкой адгезивной активностью. Гомологических фагов не имеется. Штамм безвреден, не токсичен, авирулентен.

Рост на твердых питательных средах. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 растет на простых питательных средах. Наблюдается пленочный рост на поверхности агара.

30 Рост на жидких питательных средах. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 растет на поверхности жидких питательных сред или наблюдается равномерное помутнение бульона.

Биохимическая активность штамма. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 способен утилизировать глюкозу, ксилозу, маннит, сахарозу, мальтозу и эскулин. Не утилизирует лактозу и салицин. Не образует газа при расщеплении глюкозы, восстанавливает нитраты
35 до нитритов, не продуцирует индол, сероводород, не обладает: уреазой, гемолитической и лецитиназной активностью. Продуцирует ферменты: липазу, протеазу, амилазу. Гомологические фаги к штамму не выявлены.

Отношение штамма к видовым диагностическим сывороткам. Диагностических сывороток не имеется.

40 Генетические особенности штамма (ауксотрофность, устойчивость к антибиотикам и т.п.). Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 не имеет плазмид, устойчив к гентамицину, эритромицину.

Активность (продуктивность) штамма, а также другие производственные показатели штамма. Продукт, синтезируемый штаммом, - биологически активные вещества,
45 оказывающие антагонистическое влияние на условно-патогенные и патогенные микроорганизмы. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 оказывает пробиотическое влияние на условно-патогенные и патогенные штаммы микроорганизмов.

Активность штамма оценивается путем определения антагонистических свойств плодом отсроченного антагонизма или при совместном культивировании с тест-штаммами. Штамм
50 бактерий *Bacillus subtilis* 1719 - продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов. Перспективен для создания пробиотических препаратов.

Условия и состав сред для хранения. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 хранят на

полужидком агаре замороженным при $T=-70^{\circ}\text{C}$ в течение 1 года.

Условия и состав сред для размножения штамма. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 размножают путем посева на жидкие и агаризованные питательные среды (мясопептоновый бульон, мясопептоновый агар, среда Гаузе №2, картофельно-глицериновая среда).

Условия и состав сред для продукции токсина, антигенных фракций, пигмента и других продуктов жизнедеятельности клеток. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 токсинов не продуцирует. На агаризованных средах колонии штамма образуют пигмент от бежевого до розового.

Пример. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 выделен в микробиологической лаборатории ГУ НИИВС им. И.И.Мечникова. Штамм антагонистически активен в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Shigella*, *Escherichia* и грибов рода *Candida*, а также ферментов (протеолитических, амилазных, липолитических). Изучение адгезивных свойств на эритроцитах человека (0 группы Rh) показало низкую адгезивную активность представляемого на депонирование штамма. В экспериментах на различных животных штамм оказался безвреден, не токсичен, авирулентен. Плазмиды в изученном штамме не обнаружены. Изучена пробиотическая активность культуры *Bacillus subtilis* 1719 в опытах *in vivo* на модели экспериментального дисбиоза, индуцированного введением антибиотика широкого спектра действия - доксицилина. Культура *Bacillus subtilis* 1719 при коррекции дисбиоза приводила к восстановлению до исходного уровня численности фекальных эшерихий с полным исчезновением *lac*-вариантов, способствовала элиминации условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, не влияла на численный состав бифидобактерий и нормализовала уровень лактобактерий. При экспериментальном дисбиозе исследовано влияние живой культуры *Bacillus subtilis* 1719 на функциональную активность фагоцитирующих клеток (нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов). О выраженности реакции судили по показателям НСТ-теста и метода хемилюминисценции. Наблюдалась нормализация функциональной активности нейтрофилов и макрофагов до уровня здоровых животных. Кроме того, при коррекции дисбиоза культурой *Bacillus subtilis* 1719 происходило восстановление уровня некоторых цитокинов.

Широкий спектр антагонистической активности, низкий уровень адгезивной активности продукция комплекса различных ферментов, иммуномодулирующая активность характеризуют штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 как перспективный для создания на его основе препаратов-пробиотиков и использование его в качестве продуцента ряда ферментов.

Таблица 1		
Адгезивная активность штаммов <i>B. subtilis</i> .		
Исследуемые штаммы	Адгезивная активность	
	Индекс адгезивности микроорганизма (ИАМ), $(X \pm m)$	Уровень адгезивности
<i>B. subtilis</i> №1719	$1,53 \pm 0,08$	Низкий
<i>B. subtilis</i> №1594	$2,84 \pm 0,47$	Средний
<i>B. subtilis</i> №1318	$3,08 \pm 0,33$	Средний

Как видно из представленных данных, штамм *B. subtilis* 1719 обладал низкой адгезивной активностью (ИАМ составлял $1,53 \pm 0,08$), а штаммы №1594 и №1318 - средней (ИАМ - $2,84 \pm 0,47$ и $3,08 \pm 0,33$ соответственно).

Таким образом, изученные штаммы характеризовались широким спектром антагонистической активности, низким и средним уровнем адгезивности.

Определение антибиотикостойчивости и плазмидного профиля штаммов *B. subtilis*

Антибиотикостойчивость штамма, кандидата в препараты-пробиотики, является одним из важных свойств, определяющих возможность его применения совместно с антибактериальными препаратами. В связи с этим проведено изучение антибиотикорезистентности штаммов *B. subtilis* по отношению к 14 антибиотикам, наиболее часто применяемым в клинике. Штамм *B. subtilis* 1719 оказался устойчив к гентамицину,

полимиксину и эритромицину, а штаммы *B.subtilis* 1594 и *B.subtilis* 1318 резистентны только к гентамицину.

Полученные данные представлены в табл.2.

5

10

15

20

Таблица 2.			
Определение антибиотикоустойчивости штаммов <i>B.subtilis</i>			
Антибиотик	Диаметры зоны задержки роста (мм), (X±m)		
	Штаммы <i>B.subtilis</i>		
	1719	1594	1318
Кларитромицин	17±0,5	22±0,6	26,2±0,7
Цефтазидим	27,6±0,6	23,5±0,7	30,2±0,5
Цефутоксим	23±0,4	22,4±0,5	33,6±0,6
Ципрофлоксацин	21±0,5	23±0,6	29,6±0,4
Цефтриаксон	23±0,7	27,5±0,3	24±0,6
Доксициклин	22,8±0,4	19,5±0,4	24,6±0,5
Эритромицин	16,2±0,6	21,5±0,5	23,6±0,8
Цефотаксим	28,4±0,5	21±0,4	28,6±0,6
Гентамицин	9±0,5	6,4±0,5	11,6±0,5
Офлоксацин	15,8±0,3	16±0,6	20,6±0,4
Бензилпенициллин	20±0,3	25±0,5	23±0,7
Полимиксин	10±0,4	16±0,9	18±0,7
Линкомицин	25±0,7	27±0,5	25±0,6
Рифампицин	25±0,7	30±0,9	24±0,5

Штамм *B.subtilis* 1719 оказался устойчив к гентамицину, полимиксину и эритромицину, а штаммы *B.subtilis* 1594 и *B.subtilis* 1318 резистентны только к гентамицину.

Представляло интерес выяснить, связана ли устойчивость к антибиотикам с хромосомной локализацией генетического детерминанта этого признака или с наличием плазмид.

Влияние штамма *B.subtilis* 1719 на макроорганизм

Изучение токсичности, токсигенности, вирулентности и пробиотической активности штамма *B.subtilis* 1719 в опытах *in vivo*

Изучение пробиотических культур на вирулентность, токсичность, токсигенность и безопасность является обязательным условием. Поэтому следующим этапом работы являлось изучение этих свойств. Как видно из представленных данных (табл.3), штамм *B.subtilis* 1719 не обладал вирулентностью в испытанных концентрациях. Все животные оставались живыми в течение периода наблюдения (5 суток), ни у одного из них не выявлены признаки заболевания.

40

45

50

Таблица 3						
Изучение вирулентности штамма <i>B. subtilis</i> 1719						
Количество животных		Вводимая доза, (м.к./мл)	Кратность введения	Количество животных		
				заболевших	павших	выживших
Опыт		Внутрибрюшинно				
	10	0,5 млрд.	1	0	0	10
	10	1 млрд.	1	0	0	10
	10	2 млрд.	1	0	0	10
		Перорально				
	10	1 млрд.	5	0	0	10
	10	2 млрд.	5	0	0	10
	10	3 млрд.	5	0	0	10
	10	5 млрд.	5	0	0	10
Контроль		Внутрибрюшинно				
	10	0,9% NaCl	1	0	0	10
		Перорально				
	10	0.9% NaCl	5	0	0	10

Далее проведено изучение токсичности *B. subtilis* 1719. Полученные результаты (табл.4) свидетельствовали об отсутствии токсичности у изучаемого штамма.

Таблица 4.

Исследование токсичности штамма <i>B. subtilis</i> 1719.						
Количество животных		Вводимая доза, (м.к./мл)	Кратность введения	Количество животных		
				заболевших	павших	выживших
Опыт		Внутрибрюшинно				
	10	1 млрд.	1	0	0	10
	10	2 млрд.	1	0	0	10
	10	3 млрд.	1	0	0	10
		Перорально				
	10	1 млрд.	5	0	0	10
	10	2 млрд.	5	0	0	10
	10	3 млрд.	5	0	0	10
	10	5 млрд.	5	0	0	10
Контроль		Внутрибрюшинно				
	10	0,9% NaCl	1	0	0	10
		Перорально				
	10	0,9% NaCl	5	0	0	10

На следующем этапе определяли токсигенность штамма *B. subtilis* 1719 (табл.5). В 5-дневный период наблюдения после окончания курса инъекций или перорального введения все животные оставались активными, хорошо поедали пищевые рационы, прибавляли в весе; физиологические функции и поведенческие реакции у них не изменялись. Гибели мышей не отмечено. Всех подопытных животных, и контрольных в том числе, после окончания срока наблюдений умерщвляли, вскрывали, а их органы подвергали визуальному изучению. Результаты вскрытия показали, что сердце, легкие, желудок, петли тонкого и толстого кишечника, печень, почки и селезенка по размерам, форме, окраске не отличались от органов контрольных животных.

Исследование токсигенности штамма <i>B. subtilis</i> 1719.						
Количество животных		Вводимая доза, (мл)	Кратность введения	Количество животных		
				заболевших	павших	выживших
Опыт	Внутрибрюшинно					
	10	0,5	1	0	0	10
	10	1,0	1	0	0	10
	10	1,5	1	0	0	10
	Перорально					
	10	1,0	5	0	0	10
	10	2,0	5	0	0	10
	10	3,0	5	0	0	10
	10	5,0	5	0	0	10
	Контроль	Внутрибрюшинно				
10		1,5	1	0	0	10
Перорально						
10		5,0	5	0	0	10

С целью более полного изучения безопасности штамма испытаны возрастающие дозы штамма при разовом пероральном введении мышам (табл.6). Установлено, что однократное введение per os больших доз (20×10^9 м.к./мл) *B. subtilis* 1719 приводило к незначительному снижению веса (или вес не изменялся) животных на первые сутки после введения, в последующие дни вес животных нарастал. В группах, получавших 0,9% NaCl, при всех способах введения гибели животных не отмечено.

Изучение безопасности штамма <i>B. subtilis</i> 1719 при разовом пероральном введении.						
Группы животных	Вводимая доза (м.к./мл.)	Кол-во животных		Средняя масса животных, (г) ($\bar{X} \pm m$)		
		выживших	павших	до введения	Через 1 сутки	Через 5 суток
1	5 млрд.	10	0	15,4 $\pm$ 0,3	15,6 $\pm$ 0,2	16,9 $\pm$ 0,2
2	10 млрд.	10	0	15,6 $\pm$ 0,3	15,3 $\pm$ 0,3	16,5 $\pm$ 0,2
3	20 млрд.	10	0	14,8 $\pm$ 0,3	14,1 $\pm$ 0,3	15,4 $\pm$ 0,2

Таким образом, проведенные исследования показали, что штамм *B. subtilis* 1719

является нетоксичным, нетоксигенным и авирулентным, т.е. безопасным.

Влияние культуры *B.subtilis* 1719 на микрофлору кишечника мышей изучали при экспериментальном дисбиозе, индуцированном введением антибиотика широкого спектра действия - доксициклина.

- 5 При создании модели дисбиоза выявлено, что при введении антибиотика в дозе 10 мг/мышь, по-видимому, развивался декомпенсированный дисбиоз (наблюдалась элиминация всей нормальной микрофлоры), что выражалось в гибели животных на 1-2
- 10 сутки после аппликации доксициклина гидрохлорида. При введении антибиотика в дозе 7 мг/мышь наблюдалась та же картина, только животные погибали на 4 сутки. Введение дозы
- 5 мг/мышь позволило получить модель дисбиоза, при которой происходила контаминация кишечника животных условно-патогенной и патогенной микрофлорой, при этом животные оставались живы.

Формула изобретения

- 15 Штамм бактерий *Bacillus subtilis* ГИСК им. Л.А.Тарасевича 277 - продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилалитических и липолитических ферментов.

20

25

30

35

40

45

50