

БИОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАЦИЛЛ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩАЯ ИХ ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

Л.А. Сафронова, В.М. Иляш

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

Охарактеризованы аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* в качестве продуцентов широкого спектра биологически активных веществ, представляющих интерес для биотехнологии. Рассмотрены принципы отбора штаммов, перспективных для создания пробиотиков. Проведен анализ данных биосинтетической активности бацилл, обуславливающих их пробиотический эффект.

Ключевые слова: *Bacillus*, пробиотики, антимикробная активность, биологически активные вещества, антибиотики, ферменты.

Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* семейства *Bacillaceae* широко распространены в природе и встречаются повсеместно – в воде, воздухе, в почве и пищевых продуктах, а также в организме человека и животных [1, 2]. Представители рода *Bacillus* отличаются высокой биологической активностью. Они обладают выраженным антагонизмом к возбудителям различных заболеваний человека, животных и растений, синтезируют различные по своей природе и механизму действия антибиотики, а также ферменты, аминокислоты, полисахариды, витамины и другие соединения.

Род *Bacillus* насчитывает 77 видов и объединяет обширную группу аэробных или факультативно анаэробных грамположительных хемоорганотрофных микроорганизмов палочковидной формы, образующих термоустойчивые эндоспоры. Типовой вид – *B. subtilis* (Ehremberg) Cohn 1872, 174.

Brevibacillus – род аэробных спорообразующих бактерий, который был предложен после повторной генетической классификации штаммов, ранее входивших в группу *Bacillus brevis*. В настоящее время все 10 видов этой группы (*brevis*, *agri*, *centrosporus*, *choshinensis*, *parabrevis*, *reuszeri*, *formosus*, *borstelensis*, *laterosporus*, *thermoruber*) официально признаны представителями рода *Brevibacillus*. Следует отметить, что идентификация представителей рода *Bacillus*, изначально основанная на фенотипических признаках, всегда была недостаточно точна. По мере появления новых современных молекулярно-биологических методов исследования систематика рода *Bacillus* за последнее время претерпела большие изменения. Но даже более прогрессивный генетический подход к идентификации на основе определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК также оказался недостаточно чувствительным для надежной

идентификации некоторых близкородственных видов [3].

Представители рода *Bacillus* обладают способностью образовывать эндоспоры, поэтому характеризуются устойчивостью к экстремально неблагоприятным условиям внешней среды. Благодаря этому свойству они широко распространены в природе и имеют преимущество перед микроорганизмами других таксономических групп в плане их использования в биотехнологии [4].

Бактерии рода *Bacillus* как пробиотики. Бактерии рода *Bacillus* являются важными компонентами экзогенной микрофлоры человека и животных. В желудочно-кишечный тракт они попадают либо из окружающей среды, либо в результате употребления в пищу ферментированных продуктов питания. На слизистых оболочках ротовой полости, глотки, а затем и желудка споры микроорганизмов активизируются и переходят к вегетативному росту. Была показана способность этих микроорганизмов расти и оставаться в организме хозяина в течение некоторого времени [5]. Продолжительность их пребывания в желудочно-кишечном тракте в основном определяется, с одной стороны, генетическими особенностями микроорганизма, а с другой – патологическими процессами в организме хозяина [6].

Востребованным и перспективным направлением современных исследований бацилл является разработка на их основе пробиотических препаратов для ветеринарии и медицины.

Пробиотики – это препараты на основе живых микроорганизмов, которые при использовании в адекватных количествах оказывают положительный эффект на здоровье организма-хозяина [7].

Оценивая перспективность бактерий рода *Bacillus* как пробиотиков, I. Soroculova (2008, 2013) указывает на следующие их преимущества перед другими представителями экзогенной микрофлоры: экспериментально доказанная безвредность представителей рода *Bacillus* даже в высоких концентрациях; высокая антимикробная и ферментативная активность; способность синтезировать аминокислоты и витамины; позитивное влияние на иммунологический статус организма хозяина и понижение уровня холестерина в крови; антимутагенные свойства; устойчивость к литическим ферментам и обусловленная этим высокая жизнеспособность во время пребывания в желудочно-кишечном тракте; экологическая безопасность [5,8].

Интерес к бациллам как к пробиотикам существенно вырос за последние 15 лет. Это связано с накоплением научных данных, демонстрирующих их профилактическую и терапевтическую эффективность при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, нарушениях иммунного статуса и обмена веществ [4].

Лечебный эффект пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* определяется суммой специфических активностей, которыми обладают эти микроорганизмы и продукты их метаболизма. Механизм комплексного лечебного действия препаратов из живых микробных культур в большой степени обусловлен наличием у пробиотических штаммов целого ряда полезных для макроорганизма свойств, в частности, способности к продукции разнообразных биологически активных соединений [5, 8, 9].

Сегодня международные организации (FAO/WHO) предьявляют стро-

гие требования к оценке пробиотических штаммов и препаратов на их основе. В том числе требуется точная идентификация микроорганизмов и комплексная характеристика биологической активности и безопасности препарата [9,10].

Синтез бактериями антибиотических веществ. Одним из основных биологических свойств бактерий рода *Bacillus*, определяющих их пробиотический эффект, является антагонистическая активность по отношению к широкому спектру патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Антагонизм бацилл напрямую связан со способностью представителей разных видов синтезировать антибиотические вещества. Сегодня известно около 800 антибактериальных соединений, синтезируемых бактериями рода *Bacillus* [11-14]. Культуры аэробных спорообразующих бактерий с высокой антимикробной активностью выделяют из различных экониш, в том числе из мест обитания, характеризующихся экстремальными условиями выживания. Так, известны данные о выделении штаммов бактерий *Bacillus subtilis* из почв вечной мерзлоты, которые обладали высокой антагонистической активностью в отношении микроорганизмов, патогенных для человека, животных и растений, что позволяет существенно расширить диапазон их применения [15]. Из резервуаров для хранения масла выделены штаммы бацилл, способные вырабатывать антимикробные субстанции, подавляющие рост родственных видов [16]. В тканях морской губки *Aplisina aerophoba* обнаружены бациллы, обладающие антифунгальной и антибактериальной активностью. При помощи современных генетических методов идентификации штаммы были отнесены к видам *B. subtilis* и *B. pumilus* [17]. Из бассейна реки Амазонки были выделены штаммы вида *Bacillus licheniformis*, образующие вещество, подобное бактериоцину, антимикробная активность которого проявлялась по отношению к широкому кругу индикаторных штаммов – *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, а также клиническим изолятам *Streptococcus* spp. [18]. Из почв разных типов выделили 1031 изолят, среди которых было описано достаточно большое количество бацилл, образующих антибиотики. Среди выделенных штаммов были выявлены микроорганизмы, эффективно подавляющие рост ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также фитопатогенных грибов, вызывающих заболевания сельскохозяйственных растений [19]. Активные штаммы бацилл постоянно обнаруживаются в микробиоте человека и животных. Так, при микробиологическом исследовании желудочно-кишечного тракта бройлеров были выделены 237 изолятов рода *Bacillus*. При помощи генетического анализа они идентифицированы как *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. firmus* и *B. licheniformis*. Споры всех изученных бацилл обладали пробиотическими свойствами, что позволяло им выжить в сложной ассоциации микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Их антимикробная активность проявлялась в отношении таких групп бактерий, как условно патогенные бациллы, клостридии, стафилококки и листерии. Выделенные штаммы были чувствительны к большинству испытанных антибиотиков, поэтому не могут выступать в качестве доноров переноса детерминант резистентности к антибиотикам для резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, что является необходимым условием при отборе штаммов для создания пробиотиков [20].

Обнаружена активность аэробных спорообразующих бактерий и в отношении представителей рода *Vibrio*. Показано, что штамм *B. subtilis* ВТ23 обладает ингибирующим эффектом против бактерий *V. harveyi* – возбудителя заболеваний ракообразных. При их взаимодействии с бациллами на агаризованной среде количество клеток вибрионов уменьшалось на 90 % [21]. М. Touraki (2012) охарактеризовал штаммы *B. subtilis* и *L. plantarum*, которые также проявляют антагонистическую активность к бактериям рода *Vibrio* [22]. Результаты исследований, проведенных на личинках морского окуня (*Dicentrarchus labrax*), свидетельствуют о том, что антимикробные вещества *B. subtilis* более эффективно подавляли развитие вибрионов по сравнению с *L. plantarum* [22].

Культуры вида *B. thuringiensis*, широко используемые как биоинсектициды, продуцируют также пептидные соединения, характеризующиеся антибактериальной и фунгистатической активностью [23,24]. Yudina T.G. с соавторами (2009) установили, что белки (Cyt и Cry), продуцируемые энтомопатогенными бактериями *B. thuringiensis*, полифункциональны, так как являются не только токсинами для насекомых, но и антибиотиками, которые действуют на некоторые виды бактерий, архей, микроскопических грибов [25]. Известно, что штаммы *B. thuringiensis* способны синтезировать бактериоциноподобные субстанции, такие как тоцицин (10.5 kDa), характеризующийся эффективностью только в отношении близкородственных видов. Кроме того, данными бактериями синтезируется большой класс антимикробных веществ – турицинов с широким спектром действия. Описаны турицин S, который подавляет рост *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* и *Pseudomonas aeruginosa*; турицин H – *Bacillus* spp., *Geobacillus stearothermophilus*, *Listeria* spp., *S. aureus* и *Carnobacterium maltaromaticum*; турицин 17 – активный в отношении *Bacillus* spp., включая штаммы *B. cereus* [26].

Известно, что большинство идентифицированных антибиотиков, образуемых бактериями рода *Bacillus*, являются полипептидами [14, 27-29]. Антибиотики имеют низкий молекулярный вес и отличаются как по своей структуре, так и по спектру микроорганизмов, на которые они действуют. В основном антибиотики представляют собой не одиночные вещества, а группу близких по химическим и биологическим свойствам веществ с разным количеством аминокислотных остатков. Антибиотики, продуцируемые бациллами, воздействуют на генетический код бактерий и нарушают у них процесс синтеза белка [30].

Представители вида *B. subtilis* являются наиболее продуктивными и образуют около 70 различных антибиотиков, *B. polymyxa* – более 20 полимиксинов, *Brevibacillus* – 23 антибиотических вещества полипептидной природы и т.д. Среди них встречаются аминокликозиды (бутирозин, амикомацин), липопептиды (сурфактин, фенгицин, итурин), фосфоросодержащие триены (протицин), гликопептиды (антибактериальный фактор ВАФ), полиеновые антибиотики (бациллаен, диффицидин) [17, 29, 31-35].

Следует отметить, что антибиотики, выделяемые из бактерий рода *Bacillus*, исследованы недостаточно и многие из них находятся на стадии активного изучения. Однако некоторые из них нашли широкое применение в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Это полимиксины, колистин, бацитрацин, грамицидин, тиротрицин [36].

Антибиотики, продуцируемые бациллами, классифицируют как рибосомальные пептидные антибиотики, которые синтезируются во время активного роста, и нерибосомальные, синтезируемые бактериальной культурой в стационарной фазе [30]. Большинство антибиотиков, образуемых *Bacillus* sp., являются нерибосомальными. При их биосинтезе формирование пептидной связи происходит без участия рибосом, но с вовлечением в процесс многофункциональных специфических пептидных синтетаз [27]. Значительная часть пептидных антибиотиков, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, активны в отношении грамположительных бактерий [28, 37]. Тем не менее, такие соединения, как полимиксин, колистин и циркулин проявляют активность только к грамотрицательным бактериям, в то время как бациломицин, микобациллин и фунгистатин являются эффективными средствами против плесневых грибов и дрожжей [12].

Полимиксины из *B. polymyxa* характеризуются узким спектром действия и высокой токсичностью. Впервые полимиксин В стал доступным для клинического использования в 1947 г. В 1970-х годах полимиксины были заменены в медицинской практике на менее токсичные антибиотики широкого спектра действия. В настоящий момент они становятся вновь востребованными в связи с распространением устойчивости патогенных бактерий к широко применяемым антимикробным химиопрепаратам. В некоторых странах их рассматривают в качестве препарата выбора для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [38]. Основное клиническое значение имеет активность полимиксинов (В и М) в отношении *P. aeruginosa*.

Один из наиболее изученных и востребованных полипептидных антибиотиков из бацилл, выпускаемых промышленностью – бацитрацин, представляет собой смесь 10 близких по структуре антибиотиков. Бацитрацин А наиболее активный из них: ингибирует рост грамположительных бактерий путем блокирования синтеза клеточной стенки и изменения проницаемости клеточных мембран [39].

Механизм антибактериального действия полипептидных антибиотиков может быть реализован через образование пептидами коротких кольцевых или псевдокольцевых структур, которые образуют поры в клеточной мембране, например в начальных стадиях деления клетки, и вызывают выход ее содержимого во внешнюю среду [14]. Однако полипептидные антибиотики характеризуются высокой токсичностью, поэтому не получили широкого распространения в медицинской практике [38].

Штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis* обладают способностью синтезировать циклические липопептидные антибиотики [35, 40]. Основные компоненты этих антибиотиков – сурфактин и фенгицин, характеризуются множественной биологической активностью, низкой токсичностью и имеют потенциал для применения в медицине в качестве противоопухолевых, противовирусных, антибактериальных и гипохолестеринемических средств [41]. Липопептиды из бацилл также проявляют выраженную ингибирующую активность по отношению к различным видам патогенных грибов, поэтому многие штаммы *Bacillus* предложены в качестве агентов биологического контроля болезней растений [40, 42]. Из образца курильской губки *Stelletta validissima* выделен штамм *Bacillus subtilis* КММ 1922, продуцирующий бациломицин Д – антифунгальный пептидный

антибиотик итуриновой группы. Структура соединения была установлена на основании данных двумерной ЯМР-спектроскопии, тандемной электрораспылительной масс-спектрометрии и анализа литературных данных [43].

Недавно были описаны новые антибиотики из бацилл – макролактин, диффицидин и бациллаен [31, 32]. Макролактин эффективно подавляет даже мультирезистентные штаммы бактерий, невосприимчивые к действию многих других антибиотиков. Субстанция под названием «7-О-малонил-макролактин А» уже доказала свою эффективность в борьбе с такими патогенами, как метициллин-резистентный золотистый стафилококк, ванкомицин-резистентный энтерококк и некоторые другие возбудители наиболее опасных госпитальных инфекций. Имеются также данные об антивирусных, противовоспалительных и антираковых свойствах макролактоина. В геноме *B. amyloliquefaciens* были обнаружены генные кластеры PKS, участвующие в синтезе диффицидина, макролактоина и бациллаена [31]. Бациллаен в низких концентрациях обладает бактериостатическим и бактерицидным действием по отношению к широкому спектру бактерий и грибов. Диффицидин характеризуется активностью по отношению к аэробным и анаэробным бактериям. Многие из чувствительных к нему патогенов человека были устойчивы к одному или нескольким антиботикам.

Пробиотический штамм *B. subtilis* 3 (входит в состав биоспорина), обладает антагонистическими свойствами по отношению к энтеропатогенным видам бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококкам, дрожжеподобным грибам, включая антибиотикорезистентные штаммы. Pinchuk с соавторами (2001) обнаружили, что этот штамм проявляет антагонизм и к бактериям рода *Helicobacter* [44]. Антихеликобактерное действие пробиотика не было связано с изменением рН или повышением концентрации органических кислот в среде культивирования. Установлено, что штамм продуцирует как минимум два антибиотика, ответственных за антихеликобактерную активность *B. subtilis* 3. Все изученные представители рода *Helicobacter* были чувствительны к обоим антибиотикам. Один из этих аминокликозидных антибиотиков был идентифицирован как амикомацин А, другой – как нонамикомицин. Содержание антибиотиков в ферментационной среде составило от 1,7 до 6,8 мг/мл и от 0,75 до 2,5 мг/мл соответственно.

Активно изучаются молекулярные механизмы синтеза антибиотиков. У *B. subtilis* обнаружены два внеклеточных сигнальных пептида – феромон ComX и фактор компетенции и споруляции CSF. Эти пептиды стимулируют развитие генетической компетенции и биосинтез антибиотика в ответ на высокую клеточную плотность (quorum sensing) путем регулирования активности транскрипционного фактора ComA. Существуют два пути активации белка ComA. Один из них происходит в присутствии белка ComX, который секретируется в среду. Было показано, что синтез штаммами *B. subtilis* антибиотика бацилизина напрямую связан с ComA и CSF. Другой путь регулирования кворума – ComQ/ComX также играет существенную роль в биосинтеза бацилизина. При этом разрушение оперона *srfA* приводит к формированию бацилизин-отрицательного фенотипа, что подтверждает участие данного оперона в контроле синтеза ба-

цилизина [45]. Получение химически чистых антибиотиков представляет определенные трудности, а их применение часто приводит к побочным реакциям для макроорганизма и к формированию устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов. Использование живых бактериальных клеток, продуцирующих широкий спектр антибиотических веществ в минимальных количествах, предотвращает подавление местного и системного иммунитета, развитие побочных осложнений в виде дисбактериоза или аллергических реакций и распространение антибиотикорезистентных штаммов в окружающей среде [6, 46].

Ферменты, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*. Бактерии рода *Bacillus* синтезируют не только разнообразные антимикробные субстанции, но также являются продуцентами ферментов, полисахаридов, аминокислот и витаминов. Аэробные бациллы синтезируют ферменты разных классов, что позволяет им существовать на разных субстратах. Они также участвуют в регулировании и стимуляции пищеварения, оказывают противоаллергенное и антитоксическое действие. Среди гидролитических ферментов особо следует выделить протеазы, которые занимают ключевую позицию благодаря их важной физиологической роли в организме, а также представляют коммерческий интерес. Обычно бактерии рода *Bacillus* выделяют в среду культивирования комплекс протеолитических ферментов с близкими физико-химическими и каталитическими свойствами [36, 47]. Протеазы широко используются в качестве фармацевтических средств, а также в пищевой, кожевенной и текстильной промышленности, для проведения процесса биоремедиации и в других областях экономики [48]. Среди протеаз следует отметить эластазу – протеолитический фермент, который, в отличие от других протеолитических ферментов, способен расщеплять эластин, входящий в состав соединительной ткани. Этот фермент применяется в медицине и промышленности, а также в научных исследованиях при установлении строения пептидов.

Большая часть имеющихся в продаже протеаз микробного происхождения получены из штаммов рода *Bacillus*. Гены многих протеолитических ферментов клонированы и секвенированы, для некоторых протеинов установлены молекулярные пространственные структуры, но при этом вопросы функциональной роли и механизмов регуляции их биосинтеза до сих пор остаются недостаточно выясненными [49].

Важной областью применения протеаз является медицина и ветеринария. Например, препарат субтилизин, представляющий собой протеолитический фермент, продуцируемый бактериями вида *B. licheniformis*, лизирует некоторые виды грамотрицательных бактерий – кишечные палочки, паратифозные пастереллы, патогенные клостридии – и обладает тромболитическими и антикоагулянтными свойствами [50]. Антагонистически активные бактерии, входящие в состав препаратов споробактерин и бактиспоринпласт, продуцируют широкий спектр протеолитических ферментов, способствующих очищению очагов повреждения от некротизированных тканей при гнойных инфекциях [46, 51].

Выделены и очищены до гомогенного состояния глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа и металлоэндопептидаза, секретируемые рекомбинантным штаммом *B. subtilis* JB 203Б. Показано, что иссле-

дуремые протеиназы способны эффективно лизировать тромб. В условиях *in vitro* субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза рекомбинантного штамма *B. subtilis* обладают антикоагулянтной активностью. Металлопротеиназа же не способна влиять на процесс тромбинообразования. В связи с широким распространением сердечно-сосудистых заболеваний актуальным является поиск новых ферментов с высокой биологической активностью, специфичностью и низкой токсичностью [52]. Установлено, что исследованные сериновые протеиназы (глутамилэндопептидаза и субтилизиноподобная протеиназа) способны также оказывать цитотоксическое действие на перевиваемые линии клеток животных [53].

Мощный фибринолитический фермент (28 кДа) был получен из штамма *Bacillus vallismortis* Ace02, выделенного из традиционной корейской пищевой приправы. Полная аминокислотная последовательность фибринолитического фермента Ace02 соответствовала бактериолитическому энзиму из *Bacillus licheniformis* L27, который проявляет высокую литическую активность в отношении *Streptococcus mutans* – основного этиологического агента зубного кариеса. Обсуждается возможность применения фермента для профилактики кариеса зубов, а также в качестве эффективного тромболитика [33].

Антимикробная активность бацилл может быть обусловлена не только синтезом антибиотиков, но и литическими ферментами, которые вызывают лизис клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов. Литические ферменты представляют собой сложный комплекс, состоящий из ферментов с различной субстратной специфичностью, которые совместно или по отдельности способны осуществлять деградацию клеточной стенки микроорганизмов. Бациллы продуцируют литические ферменты типа лизоцима, а также комплекс ферментов, включающий глюканазу, маннаназу, протеазу, ацетилгексозаминидазу, амидазу и другие ферменты, способные разрушать клеточные стенки грамотрицательных микроорганизмов [54].

Описан бактериолитический фермент (29 кДа), продуцируемый *Bacillus subtilis* YU-1432, который вызывал лизис клеток микроорганизма *Porphyromonas gingivalis*, выделяемого при тяжелом течении пародонтита. Получен очищенный фермент, имеющий перспективы применения в качестве профилактического средства в стоматологии [55].

Из отходов, полученных при переработке рыбы, выделен штамм *B. proteolyticus* CFR3001 – продуцент щелочной протеазы. С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что фермент способен лизировать клетки некоторых патогенных бактерий – кишечную палочку, листерии, *B. cereus* и *Yersinia enterocolytica* [54]. Препараты из культуральной жидкости трех штаммов бактерии *Bacillus licheniformis* – S, 103 и 60.4 – активно лизировали предварительно автоклавированные клетки грамотрицательных бактерий *Proteus vulgaris* и *P. mirabilis*. Живые клетки *Proteus*, обработанные этими ферментными препаратами, лизировались в процессе их последующего автоклавирования [56].

Широко известен штамм *B. subtilis* (natto), используемый в Японии для ферментации бобов. Протеазы, синтезируемые штаммом, играют важную роль при изготовлении популярного национального продукта «Натто». Hosoі Т. с соавтор. (2000) показали, что добавление *B. subtilis*

(natto) к культуральной среде с лактобациллами приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий [57]. Предполагают, что такое позитивное влияние бацилл, возможно, обусловлено продукцией ими каталазы и субтилизина, которые оказывают ростстимулирующий эффект на клетки *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 и *L. acidophilus* JCM 1132.

В настоящее время бактерии рода *Bacillus* занимают ведущие позиции в мире в качестве объекта микробной биотехнологии, в частности для получения ферментов: протеаз, амилаз, ксиланаз, целлюлаз и пектиназ [36]. Амилазы из бацилл нашли широкое применение в пищевой промышленности, фармакологии, медицине для лечения нарушений пищеварения, при изготовлении бумаги и текстиля [58]. Целлюлазы обычно используются в кормах для животных, для очищения сточных вод, текстильной промышленности, пивоварении и виноделии, при изготовлении моющих средств [59].

Кроме поиска новых активных штаммов продолжают исследования с уже известными штаммами-продуцентами ферментов, целью которых является увеличение выхода продукта. Один из распространенных путей повышения синтеза энзимов у бацилл – оптимизация условий их культивирования. Например, при изучении влияния различных источников углерода и азота на продукцию штаммом *B. licheniformis* ATCC 12759 внеклеточной протеазы установлено, что максимальный уровень синтеза фермента наблюдается при использовании комплексных источников углерода, таких как пшеничная, рисовая мука, а также аминокислот – L-фенилаланина, L-цистеина, глицина, L-валина, L-тирозина, L-триптофана и глутаминовой кислоты. В случае добавления в среду простых сахаров наблюдалось ингибирование выхода протеазы Nurullah (2012) [60]. M. Shaheen с соавт. (2008) показали, что для продукции протеазы культурой *B. subtilis* BS1 оптимальными являются температура 50⁰С и рН 11, концентрация NaCl 1,5 и 4,5 %, а соя и казеин – лучшими питательными субстратами [61]. Согласно приведенным данным, для каждого конкретного продуцента существуют свои штаммовые особенности и предпочтения в компонентах питательной среды и условиях ферментации. Также для увеличения выхода ферментов в среду культивирования используют методы химического мутагенеза [49]. Для получения штаммов с заданными свойствами, например, с повышенной продуктивностью, с более высоким уровнем активности ферментов или устойчивости к влиянию внешних факторов, применяют методы генетической инженерии [62, 63].

Биосинтез экзополисахаридов, аминокислот, лектинов и витаминов. Еще одной важной для макроорганизма группой биологически активных веществ, синтезируемых бациллами, являются экзополисахариды (ЭПС). Промышленное производство микробных полимеров в развитых странах достигло крупных масштабов и его ежегодный прирост составляет 10% [64]. Сферой применения экзополисахаридов являются пищевая, фармацевтическая, химическая, текстильная промышленности, медицина и сельское хозяйство.

Исследовано образование экзополисахаридов морскими термофильными микроорганизмами. У штамма *Bacillus thermoantarcticus* идентифицированы 2 новых ЭПС со сложной первичной структурой и различными

повторяющимися единицами. Один из них – гетерополисахарид, состоящий из α -D-маннозы и β -D-глюкозы, близок к полимерам типа ксантана. Второй ЭПС является маннаном с повторяющимися моносахаридными остатками α -D-маннозы [65].

При помощи облучения мощным коротковолновым излучением и последующей селекции мукоидных вариантов целенаправленно был получен штамм бактерий *Paenibacillus polymyxa* 88A — продуцент высоковязкого экзополисахарида. Как заявляют авторы, новый полимер, названный полимиксаном 88A, превосходит по реологическим свойствам большинство коммерчески ценных экзополисахаридов и может быть применен в хлебопекарном производстве [66].

Описан штамм *B. mucilaginosus*, выделяющий экзополисахариды, которые могут сорбировать тяжелые металлы [67]. Установлено, что ЭПС *B. mucilaginosus* представляет собой кислый гетерогликан, в состав которого входят глюкоза, галактоза, манноза, уроновые кислоты. Разработан биосорбент, который может найти применение в медицине, например, как энтеросорбент токсичных концентраций тяжелых металлов. Возможно использование биосорбента в качестве добавки в почву с целью её экологической реабилитации. Установлена иммуностимулирующая активность полисахарида из *B. mucilaginosus* [68]. Доказана его безвредность для организма животных.

Известно, что внеклеточные полисахариды обладают способностью повышать защитный потенциал макроорганизма к бактериальным и вирусным инфекциям, активизировать фагоцитоз, продукцию лизоцима, проявлять противоопухолевое, противовоспалительное, ранозаживляющее действие, что свидетельствует о широких возможностях их применения в медицине и ветеринарии [69-71].

Из бактериального бульона, который используется в малайской народной медицине для лечения острых воспалительных заболеваний глотки, выделены 5 штаммов разных видов бактерий рода *Bacillus*, продуцирующих внеклеточные полисахариды. Охарактеризован моносахаридный состав выделенных полимеров. Обсуждается возможность применения идентифицированных полисахаридов из *Bacillus* spp. в традиционной медицине в качестве антибактериального средства [71].

Сообщается о выделении 3 видов полисахаридов из штамма *B. licheniformis* SVD1, способных проявлять иммуномодулирующий эффект. Стимуляция иммунного ответа была оценена по способности иммунных клеток продуцировать интерлейкины 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО) [70].

Экзопполисахарид с высокой антиоксидантной активностью, протективным эффектом против перекисного окисления липидов и радиации получен из культуральной жидкости штамма *Bacillus* sp. LBP32 [72].

Аэробные спорообразующие бактерии обладают способностью к синтезу свободных аминокислот [73-75]. Аминокислоты выполняют ряд важнейших функций в организме: участвуют в белковом и углеводном обмене, формировании антиинфекционной защиты организма, в обеспечении кислородом процесса образования новых клеток, являются строительным материалом для ферментов, антител и некоторых гормонов, служат источником энергии на клеточном уровне. Поэтому они могут играть существенную роль в реализации комплексного лечебно-профилактического

эффекта пробиотиков на основе бацилл. Так, установлено, что штаммы *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* УКМ В- 5139 и 5140 – основа ветеринарного препарата эндоспорина, являются продуцентами таких важных для макроорганизма свободных аминокислот, как глутаминовая кислота, валин, аланин, гистидин, пролин и триптофан [9].

Некоторые штаммы бацилл синтезируют лектины – соединения белковой природы, обладающие способностью высокоспецифично связывать углеводные рецепторы на поверхности клеток. Лектины проявляют широкий спектр биологической активности – иммуномодулирующую, анти-вирусную, антимикробную и противоопухолевую [76]. В.С. Подгорским с соавт. (2010) всесторонне изучены субъединичная организация и регуляторные особенности внеклеточного лектина штамма *B. subtilis* ИМВ В-7014 [77]. Выявлено три изоформы лектина, которые различаются по физико-химическим и биологическим характеристикам и имеют специфическое сродство к сиаловым кислотам. Разные изоформы лектина оказывают регуляторное влияние на внутриклеточные процессы, в том числе на процессы репарации, репликации и транскрипции.

Известно, что бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами витаминов – рибофлавина (витамин В2), кобаламина (В12) и биотина (В7). Последние достижения в области клонирования генов биосинтеза данных витаминов в сочетании с возможностями, предоставляемыми новыми методами геномики и метаболомики, позволили получить штаммы суперпродуцентов для промышленного использования [36, 78].

Высокая и разнообразная биологическая активность аэробных бацилл позволила им занять достойное место на мировом рынке микробиологического производства ферментов, антибиотиков, биоинсектицидов. Многочисленные научные публикации убедительно доказывают огромный потенциал бактерий рода *Bacillus* как важного объекта биотехнологии.

Таким образом, бактерии рода *Bacillus* безопасны для макроорганизма, характеризуются разносторонней биосинтетической активностью – являются продуцентами широкого спектра биологически активных веществ, позитивно влияющих на организм хозяина, поэтому представляют собой одну из самых перспективных групп микроорганизмов для создания лечебно-профилактических препаратов для человека и животных. Выраженные антимикробные свойства пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* позволяют рассматривать возможность применения препаратов на их основе как альтернативу антибиотикам, что особенно важно в эпоху широкого распространения резистентных форм патогенных микроорганизмов и снижения эффективности ряда антибиотиков. Так как свойства пробиотических препаратов определяются совокупностью биологических свойств используемых штаммов микроорганизмов, важным критерием отбора бактериальных культур является изучение их способности к синтезу активных субстанций, обуславливающих пробиотический эффект препарата.

БІОСИНТЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАЦИЛІ, ЩО ОБУМОВЛЮЄ ЇХ ПРОБІОТИЧНИЙ ЕФЕКТ

Л.А. Сафронова, В.М. Іляш

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

Резюме

Охарактеризовано аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* як продуценти широкого спектру біологічно активних речовин, що представляють інтерес для біотехнології. Розглянуто принципи відбору штамів, перспективних для створення пробіотиків. Проведено аналіз даних біосинтетичної активності бацил, які обумовлюють їх пробіотичний ефект.

Ключові слова: *Bacillus*, пробіотики, антимікробна активність, біологічно активні речовини, антибіотики, ферменти.

BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF BACILLI, DETERMING THEIR PROBIOTIC EFFECT

L.A. Safronova, V.M. Iliash

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine,
Zabolotny str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine*

Summary

Aerobic sporeforming bacteria of the *Bacillus* genus as producers of a wide spectrum of biologically active substances, which are of interest for biotechnology, have been characterized. The principles of strains selection which are perspective for probiotics creation ave been considered. The analysis on bacilli biosynthetic activity, determing their probiotic effect, has been done.

Key words: *Bacillus*, probiotics, antimicrobial activity, biologically active substances, antibiotics, enzymes

1. Diomandé S, Nguyen-The C, Guinebretière M, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. J. Front. Microbiol. 2015 doi.org/10.3389/fmicb.2015.00813.
2. Connor N, Sikorski J, Rooney A P, Корас S, Koeppel A F, Burger A, et al. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. Appl. Environ. Microbiol.2010;76:1349-58.doi: 10.1128/AEM.01988-09.
3. Goto K, Omura T, Hara Y, Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 2000;46(1):1-8.
4. Cutting SM. Bacillus probiotics. Food Microbiol. 2011;28(2):214-20.
5. Sorokulova I. Modern Status and Perspectives of *Bacillus* Bacteria as Probiotics. J Prob Health. 2013;1:e106. doi:10.4172/2329-8901.1000e106.
6. Smirnov VV, Reznik SR, Vyunitskaya VA. Sovremennye predstavleniya o mehanizmah lechebno-profilakticheskogo deystviya probiotikov iz bakteriy roda *Bacillus*. Mikrobiol. zhurn. 1993;55(4): 92-112. Russian.

7. Probiotics and prebiotics – World Gastroenterology Organisation Practice Guideline, 2008. http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf.
8. Sorokulova I. Preclinical Testing in the Development of Probiotics: Regulatory Perspective with *Bacillus* Strains as an Example. Clin. Infect. Diseases. 2008;46: 92-5.
9. Safronova LA. Probiotychni vlastyivosti bakteriy rodu *Bacillus* i vzayemodiya preparativ na yikh osnovi z makroorhanizmom : Avtoref. ...dok. byol. nauk. Kyiv, 2015; 40 s. Ukrainian.
10. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO. WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
11. Berdy J. Bioactive Microbial Metabolites. The Journal of Antibiotics. 2005 58, 1–26; doi:10.1038/ja.2005.1.
12. Awais M, Pervez A, Qayyum S, Saleem M. Effects of glucose, incubation period and pH on the production of peptide antibiotics by *Bacillus pumilus*. Afr. J. Microbiol. Res. 2008; 2:114–9.
13. Sang Y, Blecha F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. Anim. Health Res. Rev. 2008;9(2):227-35.
14. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Mol. Microbiol. 2005;56(4):845-57.
15. Tarabukina NP. Morfologicheskie, kulturalnyie i biologicheskie svoystva *Bacillus subtilis* TNP-3. Nauchnoe obespechenie veterinarnyih problem v zhivotnovodstve: Sb. nauch. tr. / RASHN. Sib. otd-nie. IEVSiDV.Novosibirsk. 2000. 438s. Russian.
16. Korenblum E, von der Weid J, Rosado AS, Sebastian GV, Continto CM, et al. Development of antimicrobial substances by bacteria *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from reservoirs for oil in Brazil. J. Appl. Microbiol. 2005;98(3):663-75.
17. Pabel CT, Hotemeister J, Wilde C, Franke P, Adler B, Bringmann G. Antimicrobial activities and matrix – assisted laser desorbition/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Mar. Biotechnol. 2003;5(5):424-34.
18. Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A. Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. Lett. Appl. Microbiol. 2004;38(4):251-6.
19. Zvenigorodskiy VI, Kuzin AI, Shagov EM, Azizbekyan RR, Zenova GM. Mikrobyi – antagonistyi (streptomitsetyi i batsillyi), vyidelennyie iz pochv raznyih tipov. Pochvovedenie. 2004;7:860-6. Russian.
20. Barbosa TM, Serra CR, La Ragione RM. Screening for bacillus isolated in the broiler gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(2):968–78.
21. Vaseeharan B, Ramasamy P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Lett. Appl. Microbiol. 2003;36(2):83-7.
22. Touraki M. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated bin *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*). World J. Microbiol. Biotechnol. 2012;28(6):2425-33.
23. Kim P. Purification and characterization of lipopeptide formed by *Bacillus thuringiensis* SMV26. J. Appl. Microbiol. 2004;97(5):942-50.

24. De La Fuente-Salcido NM, Casados-Vazquez LE, Barboza-Corona JE. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can. J. Microbiol.* 2013;59:515–22. doi: 10.1139/cjm–2013–0284.
25. Yudina TG, Konuchova AV, Revina LP, Shestakov AI, Voyushina NE, Chestukhina GG, et al. Antibacterial activity of proteins Cyt and Cry *Bacillus thuringiensis ssp. Israelensis*. *Can. J. Microbiol.* 2009;49(1):37–44.
26. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* and applications in food. In: Mendez-Vilas A, editor. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Badajoz: Formatex Research Center; 2011. p. 1102–11.
27. Joshi RD, Hamde VS, Umrikar AM, et al. Studies on production of peptide antibiotic by thermotolerant *Bacillus sp.* *Int. Multidisciplinary Res. J.* 2012;2(6):30–3.
28. Ming LJ, Epperson JD. Metalbinding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J. Inorg. Biochem.* 2002;91(1): 46–58.
29. Baidara P, Mandal SM, Chawla N, Singh PK, Pinnaka AK, Korpole S. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. *AMB Express.* 2013;3(2). doi: 10.1186/2191-0855-3-2.
30. Mannanov RN, Sattarova RK. Antibiotics Produced by *Bacillus* Bacteria. *Chem. Nat. Compounds.* 2001;37(2):117–23.
31. Fickers P. Antibiotic compounds from *Bacillus*: why are they so amazing? *Amer. J. Biochem. and Biotechnol.* 2012;8(1):40–6.
32. Youra Kang, Sumin Park, Hyun Young Kim et al. Inhibitory effects of Macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A on angiogenesis and cancer cell invasion. *FASEB J.* 2012; 26:48.8. doi:10.1096/fj.1530-6860.
33. Kim JB, Jung WH, Ryu JM, Lee YJ, Jung JK, Jang HW, Kim SW. Identification of a fibrinolytic enzyme by *Bacillus vallismortis* and its potential as a bacteriolytic enzyme against *Streptococcus mutans*. *Biotechnol Lett.* 2007;29(4):605–10.
34. Moldenhauer J, Götz DC, Albert CR, Bischof SK, Schneider K, Süßmuth RD, et al. The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for beta, gamma dehydration by a trans–acyltransferase polyketidesynthase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010;49(8):1465–7. doi:10.1002/anie.200905468.
35. Chen H, Wang I, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZI. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 47(3):180–6.
36. Schallmey M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of *Bacillus species* for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 2004;50(1):1–17.
37. Temirov YuV. Biologicheski aktivnyie vtorichnyie metabolity – peptidy, obrazuemyie termofilnyimi shtammami batsill. Avtoref. ... kand. biol. nauk. Puschino, 2004. 27s. Russian.
38. Kwa AL, Vincent HT, Matthew EF. Polymyxins: A Review of the Current Status Including Recent Developments. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 2008;37:870–83.
39. Bushra J, Farina H, Hameedand A, Safia A. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptide antibiotic production. *Pak. J. Sci.* 2007;20:26–31.

40. Romano A, Vitullo D, Senatore M, Lima G, Lanzotti V. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. J. Nat. Prod. 2013;76:2019-25. doi: 10.1021/np400119n.
41. Fox SL, Bala GA. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. Bioresour. Technol. 2000;75:235-40.
42. Melentev AI, Kurchenko VI, Leontev VN, Galimzyanova NF, Kuzmina LYu, Gilvanova EA, et al Vyidelenie i predvaritel'naya harakteristika antigribnyih soedineniy shtamma *Bacillus subtilis* IB-54 – antagonista pochvennyih mikromitsetov. Trudyi Belorus. gos. Un-ta. 2010;5(1):200-9. Russian.
43. Oleinikova GK, Dmitrenok AS, Voinov VG, Chaikina EL, Shevchenko LS, Kuznetsova T A. Bacillomycin D from the Marine Isolate of *Bacillus subtilis* KMM 1922. Chemistry Natural Compounds. 2005;41(4):461-4.
44. Pinchuk I, Bressollier P, Sorokulova I. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2001;45(11):3156-61.
45. Yazgan KA, Cetin S, Ozcengiz G. The effects of insertional mutations in comQ, comP, srfA, spo0H, spo0A and abrB genes on bacilysin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Biochim. et biophys. acta. Gene structure and Express. 2003;1626(1-30):51-6.
46. Nikitenko VI, Kopyilov VA, Nikitenko MV. Preparat «Sporobakterin», novye dannyye o mehanizme deystviya etogo i drugih zhivyyih bakterialnyih preparatov. Mezhdunar. nauchn.-prakt. konf. pamyati G.I. Goncharovoy «Probioticheskie mikroorganizmy – sovremennoe sostoyanie voprosa i perspektivy ispolzovaniya»(Moskva, 28-30 maya 2002 g.): Materialy konf.– Moskva 2002;51-2. Russian.
47. Varbanets LD, Matselyuh EV. Peptidazyi mikroorganizmov i metody ih issledovaniya. – Kiev:Naukova. dumka, 2014.Ukraine.
48. Siriporn Y, Alissara R, Masaaki Y. Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus megaterium* Isolated from Thai Fish Sauce Fermentation Process. Sci. Asia. 2006;32:377-83.
49. Matselyukh OV, Nidyalkova NA, Varbanets' LD. Osoblyvosti rostu i biosyntezy elastazy mutantnym variantom *Bacillus sp.* 27-88ELS. Biotekhnolohiya. 2011;4(3):43-50. Ukrainian.
50. Bekarev AA, Artamonov AV, Vereshchahyn EY. Immobilizirovannyiy productsiroemyiy bakteriyami *Bacillus licheniformis* subtilizin, obladayuschiy tromboliticheskim i antikoagulyantnyim svoystvami. Pat. RU 2416643 C2. 1999 May 20. Russian.
51. Yangirova ZZ. Razrabotka i izuchenie immunobiologicheskikh svoystv novogo lekarstvennogo sredstva – baktisporinplasta: Avtoref.kand. biol. nauk Ufa, 2005. – 132 s. Russian.
52. Danilova YuV, Cheremin AM, Zamaleeva AI, Mardanova AM, Zamalyutdinova NM. Tromboliticheskaya i fibrinoliticheskaya aktivnost bakterialnyih proteaz. Klet. transplantologiya i tkan. inzheneriya. 2012;3:49-51. Russian.
53. Kirillova YuM, Danilova YuV, Sharipova MR. Deystvie bakterialnyih serinovyih proteinaz na perevivaemye kulturyi kletok zhivotnyih. Klet. transplantologiya i tkan. inzheneriya. 2012;3:88-91. Russian.
54. Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, Tamil Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresource Technol. 2007;98(14): 2758-64.

55. Lee HS, Lee H. Purification and biochemical characterization of bacteriolytic enzyme from *Bacillus subtilis* YU-1432 active against *Porphyromonas gingivalis*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 2011;54(4):600-5.
56. Ryazanova LP, Ledova LA, Tsurikova NV, Stepnaya OA, Sinitysin AP, Kulaev IS. Vozdeystvie proteoliticheskikh fermentov *Bacillus licheniformis* i lizomidazyi *Lysobacter sp.* XL1 na kletki *Proteus vulgaris* i *Proteus mirabilis*. Prikl. biokhimiya i mikrobiologiya. 2005;41(5):558-64. Russian.
57. Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, Kaminogawa S. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. Can J Microbiol. 2000;46(10):892-7.
58. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 2000;31:135-52.
59. Li-Jung Y, Hsin-Hung L, Zheng-Rong X. Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. J. Mar. Sci. and Technol. 2010;18(3):466-71.
60. Nurullah A. High Level Production of Extracellular Protease from *Bacillus licheniformis* ATTC 12759 in Submerged Fermentation. Res. J. Biotechnol. 2012;7(3): 46-55.
61. Shaheen M, Aamer AS, Abdul H, Farina H. Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. Pak. J. Bot. 2008;40(5):2161-9.
62. Sanchez M, Prim N, Randez-Gil F, Pastor FIJ, Diaz P. Engineering of baker's yeast, *E. coli* and *Bacillus* hosts for the production of *Bacillus subtilis* lipase A. Biotechnol. and Bioeng. 2002;78:339-45.
63. Harwood CR, Wipat A, Pragai Z. Functional analysis of the *B. subtilis* genome. Methods Microbiol. 2002;33:336-67.
64. Sutherland IW. Bacterial exopolysaccharides: strong and sticky framework. Microbiology. 2001;147:3-9.
65. Nicolaus B, Schiano Moriello V, Lama L, Poli A, Gambacorta A. Polysaccharides from extremophilic microorganisms. Orig. Life and Evol. Bios. 2004;34(1-2):159-69.
66. Buharova EN. Ekzopolisaharid *Paenibacillus polymyxa* 88A: poluchenie, harakteristika i perspektivy ispolzovaniya v hlebopekarnoy promyshlennosti : Avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Saratov, 2004. 20 s. Russian.
67. Pestova OV. Biosintez ekzopolisaharidov bakteriyami *Bacillus mucilaginosus* v glubinniyh usloviyah kultivirovaniya i novyy aspekt ih ispolzovaniya : Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. S.-Peterburg. 2000; 21 s. Russian.
68. Nyanikova GG, Vinogradov EYa, Pestova OV, Rasulov MM. Biologicheskie svoystva ekzopolisaharidov *Bacillus mucilaginosus*. Nauch.-tehn. konf. «Fundamentalnyie i prikladnyie problemy biotekhnologii i meditsiny» (S.-Peterburg, 19–20 apr. 2000 g.): Tez. dokl. – S.-Peterburg 2000:45-6. Russian.
69. Enikeev RR. Opisaniye, biosintez i biologicheskoe deystvie polisaharida kefirnyih gribkov – kefirana. Biofarm. zhurn. 2011;3(3):11-8. Russian.
70. Van Dyk JS, Nalise Low Ah Kee L, Carminita L Frost, Brett I Pletschke. Extracellular Polysaccharide production in *Bacillus licheniformis* SVD1 and its immunomodulatory effect. BioResources. 2012;7(4):4976-93.
71. Ramanathan T, Ahmad A, Shamsuddin A, Kalimutho A, Kalimutho M. Taxonomical identity and polysaccharide produced by *Bacillus species* isolated from old aged medicinal decoctions. J. Sustainability Sci. and Manag. 2011;6(1):2-9.
72. Honggui W, Jianfeng Y, Xianyang S, Qiyang W, Nan S. Structure and bio-properties

- of extracellular polysaccharide from *Bacillus sp.* strain LBP32 isolated from Luobopo desert. J. Biotechnol. and Bioprocess Eng. 2011;16(4):761-8.
73. Smirnov VV, Reznik SR, Vasilevskaya. IA. Sporoobrazuyushchie aerobnye bakterii-producentyi biologicheskii aktivnykh veshchestv – Kyiv.:Naukova. dumka, 1982. Ukraine.
74. Tserkovnyak LS, Roy AO, Kurdysh IK Syntez aminokyslot *Bacillus subtilis* IMV V-7023 v seredovyskhi z hlitserofosfatom. Mikrobiol. zhurn. 2009;71(5):18-23. Ukrainian.
75. Nuttawut K, Chaniga C, Chiravoot P, Sarote S. Production of Poly- γ -glutamic acid by *Bacillus licheniformis* : Synthesis and Characterization. J. Metals, Materials and Minerals. 2012;22(2):7–11.
76. Tanasienko OA, Rudyk MP, Pozur VV, Potebnya GP. Influence of bacterial lectins on some reactions of nonspecificimmunity in sarcoma 37 transplanted mice. Exp. Oncol. 2010;32(4):254-57.
77. Pidhors'kyi VS, Kovalenko EO, Karpova IS, Sashchuk OV, Het'man KI. Ctrukturna kharakterystyka pozaklitynnoho lektynu – saprofitnoyi kul'tury *Bacillus subtilis* IMVV-7014. Dop. NAN Ukrayiny. 2010;9:143-9. Ukrainian.
78. Salvetti S, Celandroni F, Ghelardi E, Baggiani A, Senesi S. Rapid determination of vitamin B2 secretion by bacteria growing on solid media. J. Appl. Microbiol. 2003;95:1255-60.

Отримано 10.02.2017