

11. Белицер В. А. Методы определения фибриногена и компонентов фибринолиза плазмы крови человека (метод. рекомендации) / В. А. Белицер, Т. В. Варецкая, К. Н. Веремеенко и др. – Киев, 1983. – 20 с.
12. Ойвин И. А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований / И. А. Ойвин // Пат. физиол. – 1960. – № 4. – С. 76–85.
13. Вєрьовка С. В. Оцінка ризику післяопераційних ускладнень та рецидиву онкозахворювань верхніх дихальних шляхів за передопераційними показниками гемостатичної системи / Матеріали щорічної традиційної весняної конференції Українського наукового медичного товариства оториноларингологів «Сучасні методи діагностики і лікування запальних захворювань ЛОР-органів» / С. В. Вєрьовка, О. П. Голобородько, О. Й. Кизим та ін. // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2012. – № 3. – С. 33.
14. Rodriguez-Pineiro A. M. Protein isoforms and their special role as cancer biomarkers / A. M. Rodriguez-Pineiro, V. S. Martinez-Zorzano, P. Alvarez-Chaver et al. // Cancer Biomarkers / ed. by H. C. Kristoff. – NY : Nova Science Publishers. 2011. – P. 105–136.

Iu. Burlaka., O. Goloborodyko, A. Kizim, N. Gryn', O. Yusova, S. Verevka

THE INVESTIGATION OF LEVEL AND ACTIVITIES OF HAEMOSTATIC SYSTEM COMPONENTS IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH UPPER RESPIRATORY TRACT CANCER

Content and activities of some components of haemostasis system in blood plasma of 20 patients with cancer of upper respiratory tract in comparement to indexes of the group of 20 healthy persons were investigated. The most essential changes were inherent for patients with III stage of disease. The observed increase of coagulative link system haemostasis contrary to decrease of fibrinolytic activity testify about on possible risk of the thrombotic complications.

Keywords: upper respiratory tract cancer, haemostatic system, tissue plasminogen activator, fibrinolytic activity, α 2-macroglobulin, α 1-proteinase inhibitor, fibrinogen.

Матеріал надійшов 06.05.2013

УДК 579.62+579.676+636.087

Нечипуренко О. О., Авдєєва Л. В., Хархота М. А.

КАРОТИНСИТЕЗУВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ ТА ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

*Проведено аналіз даних літератури щодо здатності бактерій роду *Bacillus* утворювати пігменти червоних та жовтих кольорів, а також стосовно структури та біохімічних шляхів синтезу каротиноїдів. З'ясовано, що переважна більшість пігментів, які продукуються *Bacillus* spp., належать до сполук каротиноїдної природи. Окрім того, оцінено пробіотичні властивості представників роду *Bacillus* та запропоновано можливість подальшого використання каротинпродукуючих штамів у ветеринарії.*

Ключові слова: пігменти каротиноїдної природи, штами *Bacillus* spp., біосинтез, пробіотики.

Каротиноїди належать до групи природних пігментів, забарвлених у жовтий, помаранчевий та червоний кольори. Вони синтезуються рослинами, найпростішими (*Dunaliella salina*), грибами (*Blakeslea trispora*) та бактеріями (*Bacillus*, *Staphylococcus* spp. тощо). Специфічною озна-

кою каротиноїдів є наявність хромофора, що складається із низки кон'югованих подвійних зв'язків, кількість яких визначає характер забарвлення пігменту. Каротиноїдам притаманна антиоксидантна, протипухлинна та імуностимулювальна активності, а β -каротин є провітамі-

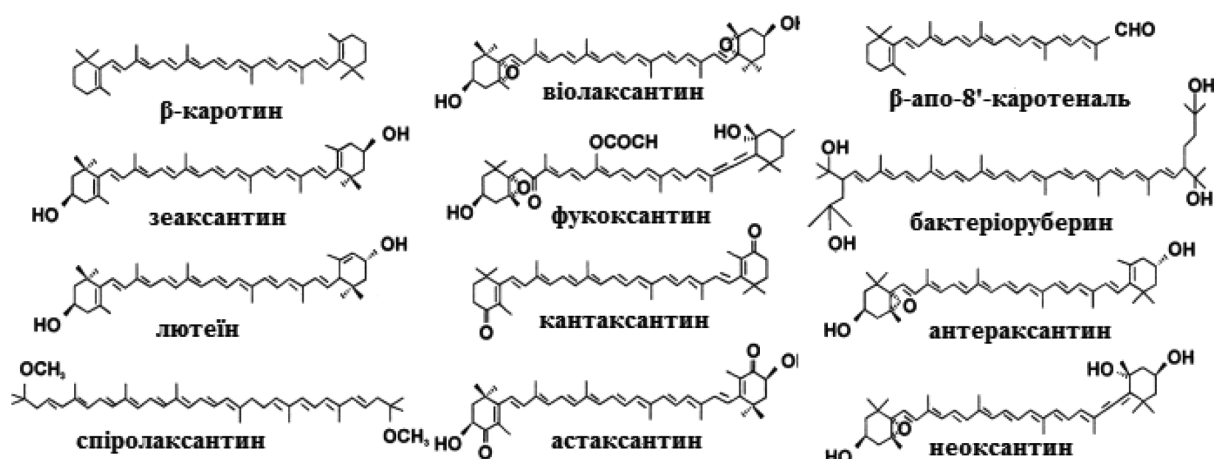


Рис. 1. Хімічна будова різних груп каротиноїдів [6]

ном жиророзчинного вітаміну групи А. З огляду на це, каротиноїди зазвичай використовуються у виробництві кормів для тваринництва, харчовій та фармацевтичній промисловостях, косметології як природні барвники або харчові добавки [1–5]. На сьогодні існують лише поодинокі публікації про каротинсинтезувальну здатність представників роду *Bacillus* і лише з'ясується можливість використання цих бактерій у складі каротинвмісних препаратів для тваринництва, тоді як на основі каротинсинтезувальних стрептоміцетів і дріжджів вже створено низку ветеринарних препаратів, проте жоден з них наразі не поєднує у собі якості каротинвмісної добавки та пробіотичного препарату.

З огляду на вищевикладене, метою роботи було проаналізувати дані щодо здатності *Bacillus* spp. синтезувати пігменти каротиноїдної природи та виявляти пробіотичні властивості, а також з'ясувати перспективи використання штамів із зазначеними властивостями у ветеринарії.

Особливості біосинтезу каротиноїдних пігментів бактеріями роду *Bacillus*

У низки представників роду *Bacillus*, а саме видів *B. indicus*, *B. vedderi*, *B. jeotgali*, *B. okuhidensis*, *B. clarkii*, *B. pseudofirmus*, *B. firmus* та інших трапляється жовта та помаранчева пігментація вегетативних клітин і спор. Пігментація зумовлена синтезом цими бактеріями каротиноїдів, які за своїми властивостями є гідрофобними та ліпофільними. На відміну від еукаріот, каротиноїди бактерій асоційовані з цитоплазматичною мембраною клітини і перебувають переважно у зв'язаному стані з білками, ліпідами та вуглеводами. Ці пігменти належать до ізопреноїдних речовин і містять у своїй структурі молекули C_5 ізопентилдифосфату [2; 3].

За хімічною структурою каротиноїди поділяють на гідрокарбони (фітофлуен, α -зеакаротин), спирти (лютеїн, зеаксантин), глікозиди (осцилоксантин), етери (сфероїдин), епоксиди (діадиноксантин, зеаксантин), альдегіди (родопінал), кетони (астаксантин, кантаксантин), апокаротеноїди (аполікопінати, аполікопінали), секокаротиноїди (β -каротин), вищі каротиноїди (бактеріоруберин), ретро і ретроапокаротиноїди (родоксантин), естери спиртів (фукоксантин, зеаксантин) та естери кислот (толулародин) (рис. 1) [6]. Вищезазначені групи каротиноїдів об'єднують у два класи: сполуки, які складаються з карбону та гідрогену; оксикаротиноїди або ксантофіли, що у структурі додатково містять молекули кисню [6]. Слід зазначити, що лише першій групі каротиноїдів притаманні антиоксидантний ефект і провітамінна активність [7].

Зазвичай каротиноїди, які синтезуються рослинами, ціанобактеріями та грибами, належать до C_{40} -каротиноїдів, у той час як інші бактерії можуть синтезувати додатково C_{30} -сполуки, що зумовлено наявністю додаткових ферментних комплексів та особливістю метаболічних процесів у прокариот [2]. Біосинтез основних груп C_{40} -каротиноїдів притаманний фотосинтезувальним бактеріям (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*), нефотосинтезувальним бактеріям родів *Pantoea*, *Paracoccus* і *Brevundimonas* та ціанобактеріям родів *Anabaena*, *Nostoc*, *Synechocystis* [8]. Натомість C_{30} -каротиноїди продукуються *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Methylobacterium rhodium* та *Methylomonas* sp. [3; 8; 9].

Наразі з'ясовано, що синтез каротиноїдів у прокариот відбувається за 2-С-метил-D-4-ерітріол-4-фосфатним (2-С-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate, *MEP*) та пренілдифосфатним шляхами з утворенням ізопренілпірофосфату (Isopentenyl Pirophosphate, *IPP*) та диметилалілдифосфату

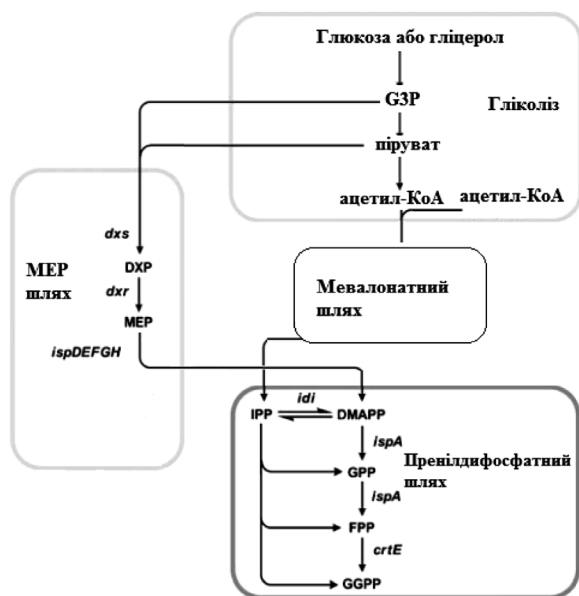


Рис. 2. Початкові етапи синтезу каротиноїдів бактеріями [10]

(**Dimethylallyl Pirophosphate, DMAPP**) через реакцію конденсації пірувату та гліцеральдегід-3-фосфату (**Glyceraldehyde-3-Phosphate, G3P**). На відміну від прокариотичних організмів, еукаріоти використовують мевалонатний шлях для конвертації ацетил-КоА у ізопреніл пірофосфат. Слід зазначити, що стрептоміцетам та рослинам притаманні обидва із зазначених шляхів (рис. 2).

Початкові реакції біосинтезу каротиноїдів каталізуються ферментами фітоїнсинтазами [2]. Ензими бактерій, грибів та рослин, які беруть участь у реакціях синтезу каротиноїдів, є гомологічними. Перша реакція біосинтезу ізопренілпірофосфату пов'язана із утворенням

1-деокси-D-ксилозу-5-фосфату (**1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate, DXP**) й каталізується 1-деокси-D-ксилозу-5-фосфатсинтазою (**1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Synthase, dxs**). Потім сполука DXP за участі DXP-редуктоізомерази перетворюється на 2-C-метил-D-еритрол-4-фосфат [10]. Далі відбувається серія послідовних реакцій MEP шляху, які каталізуються продуктами генів *ispD*, *ispE*, *ispF*, *ispG* та *ispH* з утворенням IPP та DMAPP, що ізомеризуються продуктом гена *idi* (рис. 2). Слід зазначити, що у всіх каротинсинтезувальних бактерій гени біосинтезу каротиноїдів згруповані у кластери.

Елонгація майбутнього ланцюга каротиноїдів відбувається внаслідок конденсації ізопренілпірофосфату та диметилалілдіфосфату. У результаті дії пренілдіфосфатсинтаз утворюється гераніл дифосфат (**Geranyl Pirophosphate, GPP, C₁₀**), фарнезил дифосфат (**Farnesyl Pirophosphate, FPP, C₁₅**), геранілгераніл дифосфат (**Geranyl Pirophosphate, GGPP, C₂₀**), які є попередниками моно-, секві- та дитерпенів і каротиноїдів відповідно [10]. Внаслідок конденсації молекул геранілгераніл дифосфату формується C₄₀ карбоновий ланцюг, а у результаті з'єднання двох молекул фарнезил пірофосфату, гераніл дифосфату та геранілгераніл дифосфату – C₃₀ карбонові ланцюги (рис. 3).

C₄₀ каротиноїди та C₃₀ 4,4'-діапокаротиноїди представлені симетричними терпеноїдами, у яких система трьох кон'югованих зв'язків розташована у середині молекули внаслідок формування продукту з двох симетричних попередників. Проте за результатами ЯМР-спектроскопії було виявлено, що апо-8'-каротиноїди не є симе-

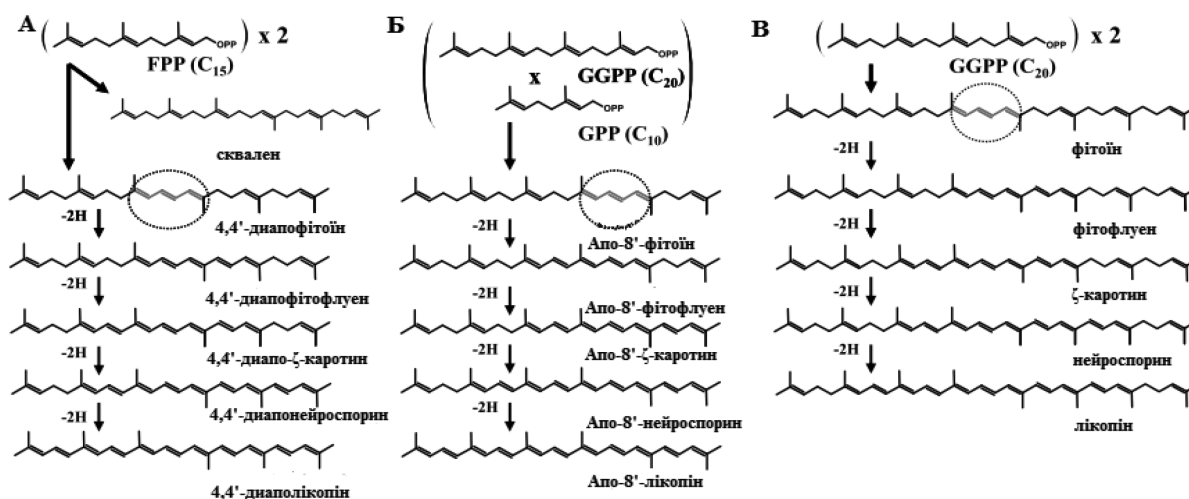


Рис. 3. Шляхи біосинтезу каротиноїдів: А – 4,4'-діапокаротиноїдів (C₃₀); Б – апо-8'-каротиноїдів (C₃₀); В – C₄₀ каротиноїдів [2]

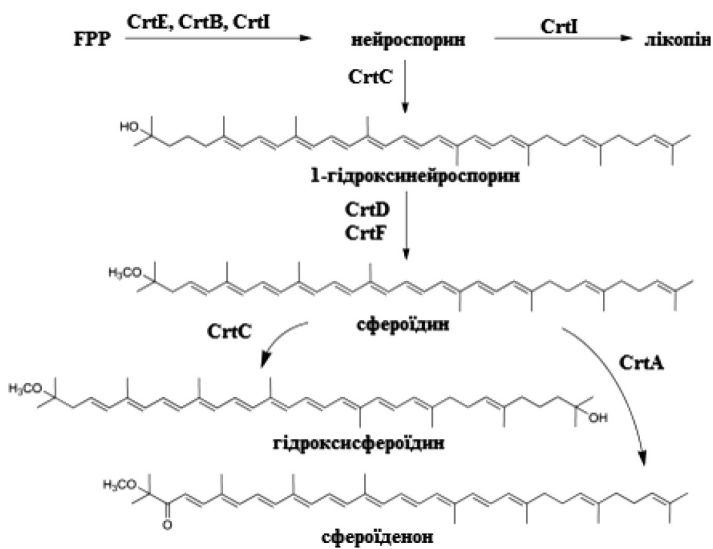


Рис. 4. Біосинтез ациклічних каротиноїдів фотосинтезувальними бактеріями *Rhodobacter capsulatus* [8]

тричні, оскільки три кон'юговані подвійні зв'язки не розташовуються у центральній частині молекули. На підставі цього було запропоновано гіпотезу синтезу відповідних каротиноїдів із C_{10} та C_{20} попередників (рис. 3). Після утворення 4,4'-діаполікопіну, апо-8'-лікопіну, лікопіну відбувається подальша модифікація речовин: глікозилювання, окиснення, метилування, ацетилювання [2; 3].

У *Bacillus* spp., які здатні синтезувати C_{30} каротиноїди з молекул фарнезилпірофосфату, ензим 4,4'-діапофітоїнсинтаза CrtM, амінокислотна послідовність якого подібна до CrtB (фітоїнсинтаза), каталізує конденсацію двох молекул фарнезилпірофосфату із утворенням 4,4'-діапофітоїну [6; 8]. Отриманий безбарвний 4,4'-діапофітоїн перетворюється на 4,4'-діапонейроспорин, потім на 4,4'-діаполікопін через послідовні реакції десатурації та ізомеризації від 15-цис до транс за участі 4,4'-діапофітоїн десатурази CrtN. Десатураза CrtN є гомологічною за будовою до FAD- залежної фітоїндесатурази CrtI, яка описана у фотосинтезувальних бактерій. У подальшому діапонейроспорин та діаполікопін окиснюються без циклізації карбонового ланцюга (рис. 3, А) [8; 11].

Вважається, що представникам роду *Bacillus* та *Halobacterium cutirubrum* притаманний C_{30} синтез каротиноїдів із утворенням апо-8' сполук та діапокаротиноїдів. До того ж, 4,4'-діапокаротиноїди виявлені у *Methylobacterium*, *Streptococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* [8; 12].

На відміну від представників роду *Bacillus*, синтез каротиноїдів у фото-

синтезувальних бактерій роду *Rhodobacter* і нефотосинтезувальних бактерій родів *Pantoea*, *Paracoccus* та *Brevundimonas* відбувається іншим шляхом [4; 5; 8]. Наприклад, у *Rhodobacter capsulatus* за участі геранілгеранілпірофосфатсинтази CrtE, фітоїнсинтази CrtB, біфункціонального ензиму фітоїндесатурази CrtI утворюється нейроспорин, який гідратується до 1-гідроксинеурспорину нейроспорин-1,2-гідратазою CrtC. Потім 1-гідроксинеурспорин-3,4-десатураза CrtD та 1-гідроксинеурспоринметилаза CrtF перетворюють продукт попередньої реакції на сфероїдин. Сфероїдин внаслідок дії сфероїдинкетлази CrtA та гідратази CrtC перетворюється на гідроксисфероїдин та сфероїденон, відповідно (рис. 4) [8].

Слід відмітити, що у рослин та ціанобактерій роль фітоїндесатурази виконує специфічний комплекс, який складається з двох дегідрогеназ, фітоїндесатурази та ζ -каротиндесатурази, каротинізомерази. За участі каротинізомерази з цисізомеру лікопіну утворюється активна трансформа. Відповідний ензим є гомологічним за амінокислотною послідовністю до протеїну CrtI, що вказує на їх спільне походження [10; 11].

Найбільш поширеними каротиноїдами у *Bacillus* spp. є окиснені похідні діаполікопіну. Діапокаротиноїди є доволі стабільними та легкорозчинними. Слід наголосити, що ці якості мають важливе значення для харчової та кормової промисловості [12]. З використанням маспектрометрії у вегетативних клітинах та спорах штаму *B. indicus* HU36 було ідентифіковано [2; 12] метил-1-(6- $C_{10,0}$)-глікозил-3,4-дегідро-апо-8'-лікопенат, метил-1-глікозил-3,4-дегідро-апо-8'-лікопенат, 1-(6- $C_{11,0}$)-глікозил-3,4-дегідро-апо-8'-лікопін та 1-глікозил-3,4-дегідро-апо-8'-лікопін (рис. 5). Каротиноїди, що входили до складу вегетативних клітин, мали жовте забарвлення, а піг-

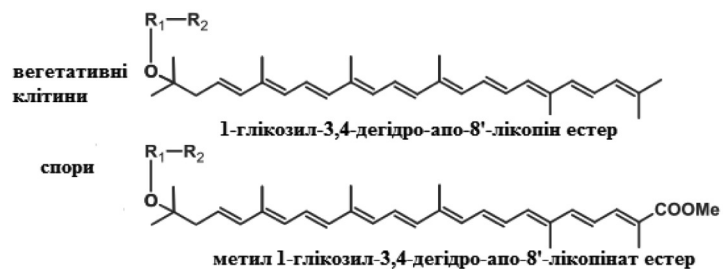


Рис. 5. Кінцеві продукти біосинтетичного шляху 8-апокаротиноїдів у пігментованих *Bacillus* spp.: R_1 – гексоза, R_2 – жирні кислоти [2]

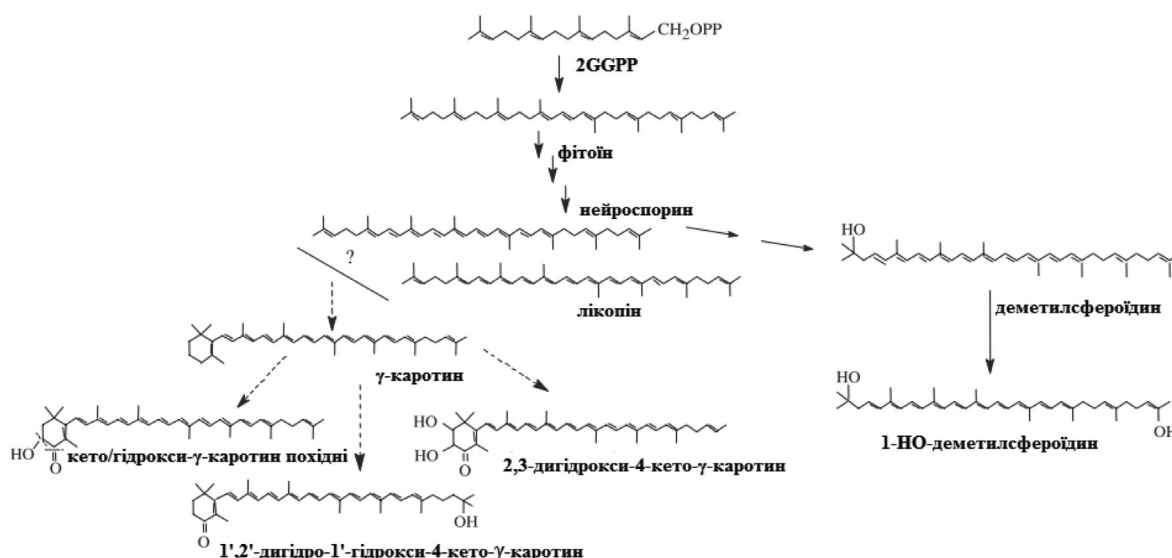


Рис. 6. Біосинтез каротиноїдів *Bacillus* sp. під час вегетаційного періоду та споруляції [1]

менти спор – помаранчеве. Така здатність бактерій роду *Bacillus* може бути використана для створення біосенсорів [2; 12].

На підставі даних тонкошарової високорідинної хроматографії було встановлено [1], що до складу вегетативних клітин та спор *Bacillus* sp. входять не лише C_{30} каротиноїди, а й C_{40} – 1-гідрокси-деметилфероїдин і кето/гідрокси- γ -каротин похідні. Також у клітинах та спорах *Bacillus* sp. було виявлено нейроспорин [1]. На підставі отриманих даних вчені запропонували схему синтезу каротиноїдних пігментів (рис. 6).

У процесі синтезу каротиноїдів дві молекули геранілгеранілпірофосфату конденсуються із утворенням фітоїну, який зазнає дегідрогенізації у C_{11} , C_{12} , $C_{12'}$, C_{13} , C_7 , C_8 позиціях із формуванням нейроспорину, що містить 9 кон'югованих подвійних зв'язків. Під час розвитку вегетативних клітин відбувається метилування, гідроксилування та дегідрогенізація ланцюга. Протягом спорування здійснюється моноциклізація карбонового ланцюга, до якого інкорпорується кето- та гідроксигрупи [1]. Відомо, що циклізація карбонового ланцюга здійснюється у нефотосинтезувальних бактерій родів *Pantonea*, *Paracoccus* та *Brevundimonas* за участі генного кластеру *crtX*, *crtY*, *crtZ*, продуктами якого є глюкозилтрансфераза *CrtX*, лікопін β -циклаза *CrtY*, β -каротин 3,3'-гідроксилаза *CrtZ* (рис. 7). Окрім від-

повідних генів, у представників родів *Paracoccus* та *Brevundimonas* залучені гени *crtW*, що кодують β -каротин 4,4'-кетотлазу, яка каталізує утворення астаксантину [13].

На сьогодні відомо, що каротинсинтезувальні штами роду *Bacillus* впливають на фізіологічний стан тварин. Так, з традиційної корейської їжі, яка складається з риби, моллюсків, креветок, устриць та ікри було виділено галотолерантні ізоляти бацил (*B. cibi*, *B. jeotgal*, *B. indicu*, *B. vietnamensis*), здатні продукувати каротиноїди. Відповідні штами належать до резидентної мікрофлори морських тварин. Вважається, що забарвлені бактерії *Bacillus* spp. беруть участь у пігментації морських організмів за рахунок наявності каротиноїдних пігментів [1; 14; 15].

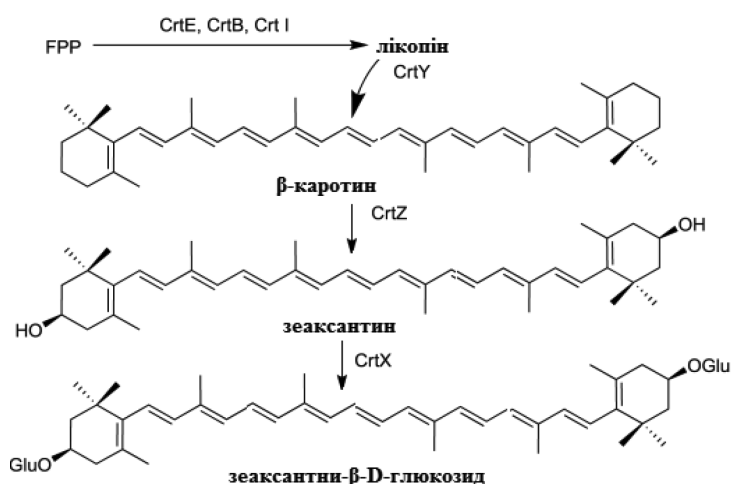


Рис. 7. Біосинтез каротиноїдів у бактерій роду *Pantoea* [8]

Таким чином, бактерії роду *Bacillus* здатні синтезувати C_{30} (4,4-діапокаротиноїди, 8-апокаротиноїди) та C_{40} (γ -каротин, деметилсфероїдин) каротиноїди, які можуть бути використані у харчовій промисловості та виробництві кормів.

Особливості аналізу бактеріальних каротиноїдів

Для аналізу та екстракції каротиноїдів з бактерій використовують переважно полярні розчинники, а саме: і суміш метанолу та хлороформу, метанол, досить рідко гексан з ізопропіловим спиртом та інші системи, у той час як екстракція рослинних каротиноїдів здійснюється неполярними розчинниками (гексан, бензол). Такі розбіжності у системах для екстракції зумовлено наявністю клітинної стінки у бактерій та відмінністю структури бактеріальних каротиноїдів. Екстракція каротиноїдів зазвичай проводиться у темряві із додаванням антиоксидантів (бутилгідрокситолуен), щоб запобігти окисненню нативної структури пігменту.

Системи для розділення та очищення екстрагованих пігментів, як правило, підбираються емпірично, проте із літературних даних відомо, що найбільш ефективними та широкоживаними комбінаціями розчинників для тонкошарової хро-

матографії є гексан:етилацетат (1:1), метанол:петролейний ефір:хлороформ (2:18:6), ацетон:гексан (3:7), петролейний ефір:ацетон (4:1), етилацетат:петролейний ефір (1:9), петролейний ефір:хлороформ (9:1), ацетон:петролейний ефір:хлороформ (5:5:4) та ацетон:метанол (9:1). Якісне підтвердження приналежності розділених пігментів до каротиноїдів здійснюється шляхом оброблення пластини 10 % фосфорномолібденовою кислотою (поява зеленого забарвлення) або концентрованою сірчаною кислотою (поява синього забарвлення) [1–3; 16; 17].

Пробіотичні властивості *Bacillus* spp.

Однією із основних проблем ветеринарії є надмірне та нерациональне використання антибіотиків, що призводить до розвитку у тварин дисбактеріозів та появи мультирезистентних штамів мікроорганізмів. Сьогодні існує низка засобів для розв'язання цієї проблеми, одним з яких є застосування пробіотичних препаратів.

Мікроорганізми, які слід застосовувати для створення пробіотиків, повинні характеризуватися: резистентністю до соляної кислоти та жовчі; здатністю адгезувати до епітеліальних клітин і колонізувати слизову оболонку кишечника; поділитися за умов шлунково-кишкового тракту;

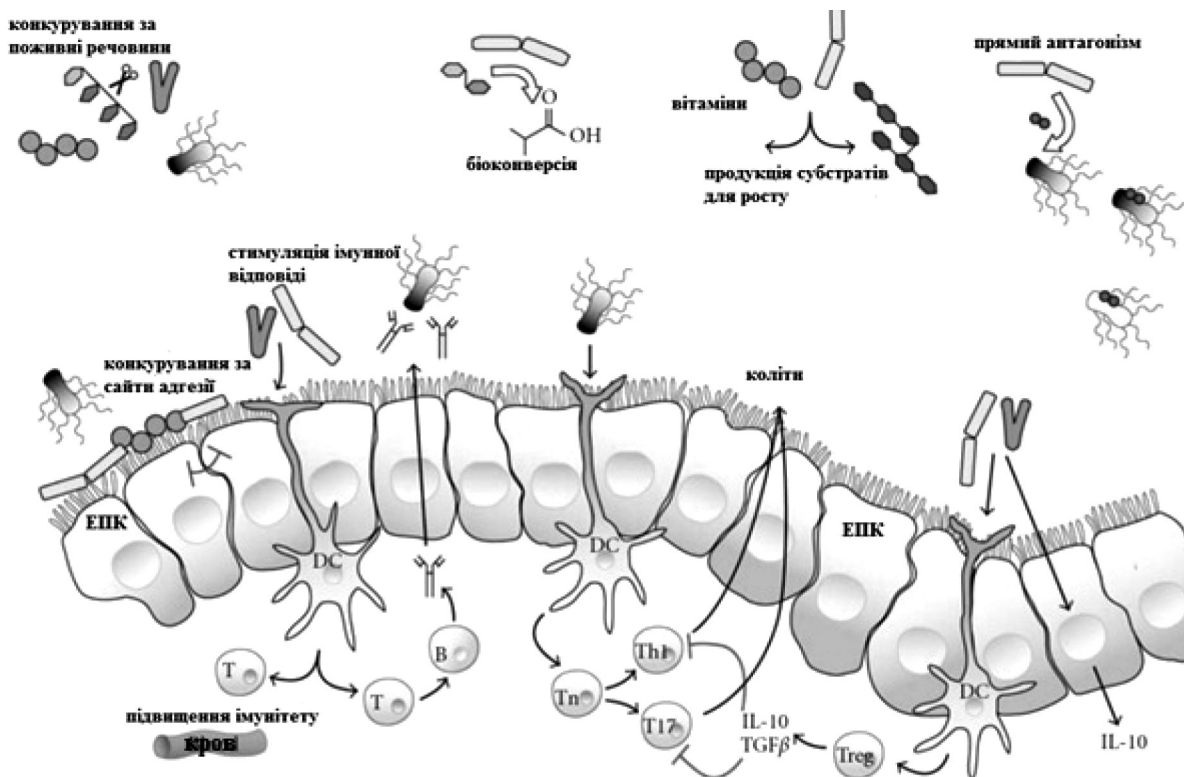


Рис. 8. Механізм дії пробіотиків [24]

нормалізацією складу мікрофлори ШКТ; антагоністичною активністю щодо патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів; здатністю персистувати у кишковоки. До того ж, пробіотичні штами бактерій мають зберігати життєздатність у харчових продуктах та ліофілізованих фармацевтичних препаратах тривалий проміжок часу; бути непатогенними і не містити генів стійкості до антибіотиків [18–22]. Зазвичай пробіотики створюють на основі бактерій родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*, але вони не завжди характеризуються високою антагоністичною активністю щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [18; 19].

Перспективним напрямом удосконалення біопрепаратів є застосування бактерій роду *Bacillus*. До того ж використання пробіотичних культур бактерій, здатних продукувати каротиноїди, надасть можливість не лише корегувати дисбактеріози, а й імовірно вирішить проблему додавання штучного β -каротину у корм. Проте біодоступність та біотрансформація, вплив на фізіологічні властивості макроорганізму та провітамінна активність бактеріальних каротиноїдів залишається недостатньо вивченою. Наразі у досліджах *in vivo* встановлено, що біодоступність каротиноїдів штамів *B. indicus* HU36 та *B. firmus* GB1 у печінці, плазмі та жировій тканині щурів перевищує біодоступність β -каротину у 9 та 3 рази відповідно. Така відмінність пояснюється більшою стабільністю та стійкістю до деградації бактеріальних пігментів [1; 8; 9].

Вважається, що механізм пробіотичної дії препаратів на основі штамів бацил пов'язаний із конкуренцією з патогенними мікроорганізмами за сайти адгезії до епітеліальних клітин кишковоки, стимуляцією імунної відповіді, зменшенням біоконверсії корму (покращення травлення) за рахунок продукування гідролітичних ферментів, синтезом метаболітів (вітаміни, антибіотики), антагоністичної активності щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (рис. 8) [23; 24].

Нині відома низка вітчизняних і закордонних препаратів, створених на основі *Bacillus* spp., що застосовуються як пробіотичні: бактисубтіл, біоспорин, ентерогерміна, біовіцерин та інші [25]. Як пробіотичні культури, переважно використовують *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. coagulans* та *B. licheniformis* через їх високу антагоністичну активність щодо умовно-патогенних і патогенних бактерій та здатність продукувати значну кількість гідролітичних ферментів. Бацilli завдяки високим адаптивним властивостям дуже поширені у природі, особливо у тих об'єктах, з

якими людина і тварина контактують найбільше. Саме тому відповідні бактерії постійно та у значній кількості потрапляють до макроорганізму, і оскільки є стійкими до літичних ферментів, зберігають життєздатність у шлунково-кишковому тракті: ріст за наявності $\geq 0,4\%$ жовчі та $\text{pH} \leq 6$ [26; 27]. До того ж, *Bacillus* spp., як правило, не є патогенними, за винятком видів *B. anthracis* і *B. cereus* [25].

Спори бактерій роду *Bacillus* проходять через тонкий відділ кишковоки й проростають у товстому відділі. Часткова адгезія спор на епітеліальних клітинах здійснюється шляхом гідрофобних взаємодій. Відомо, що бактерії *B. cereus* var *toyoi* та *B. subtilis* var. *natto* здатні персистувати у кишковоки птиці протягом 35 діб. Проте бацilli не здатні активно колонізувати кишковоки через відсутність адгезинів, тому вони належать до транзиторної мікрофлори [28; 29]. Було виявлено [21] здатність спор *B. cereus* var. *toyoi* проростати у кишковоки бройлерів та поросят, а після проведення доклінічних досліджень препаратів Вітаспорину та Іриліса показано [21], що тривалість персистенції у кишковоки *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* становить від 7 до 24 діб залежно від виду бактерій. Таким чином, *Bacillus* spp. можуть конкурувати з патогенними бактеріями за сайти адгезії на епітеліальних клітинах кишковоки. Слід зазначити про відсутність поширення бактерій роду *Bacillus* з ШКТ у паренхіматозні органи. Було встановлено, що під час додавання 1×10^9 спор *B. subtilis* до раціону мишей протягом 5 діб спори цих бактерій виявлялися лише у Пєєрових бляшках та мезентеріальних лімфатичних вузлах [21; 29; 30].

Окрім цього, *Bacillus* spp. характеризуються високою ферментативною активністю – синтезують амілази, фосфатази, протеази, глюканази, ізомерази, ліпази, казеїнази, здатні продукувати амінокислоти, пептиди та біосурфактанти (гліколіпіди, ліпопептиди, фосфоліпіди, які беруть участь у міцелоутворенні жирів) та деякі фактори росту. Наявність зазначених речовин може зумовлювати стимуляцію травлення, здійснювати протиалергійний і антиоксидантний ефект [28; 31]. Наприклад, за участі бактеріальних ензимів *B. cereus* var *toyoi* і *B. subtilis* var. *natto* значно знижується концентрація амонію у кишковоки, внаслідок цього індукується видовження ворсин, зростання площі всмоктування поживних речовин та, як наслідок, покращення біоконверсії корму [21; 22; 29].

У процесі споруляції та поділу клітин *Bacillus* spp. можуть синтезувати різноманітні антибіотики, алкалоїди (1-деоксиноїриміцин), нуклеози-

ди, феназини, терпеноїди та бактеріоцини. Відповідні сполуки забезпечують значну антагоністичну активність бацил щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій [26; 28]. Відомі також дані щодо *in vitro* пригнічення росту ентеробактерій, окрім ентерококів, під дією дипіколінової кислоти [21]. Так, було встановлено, що внаслідок одноразового перорального введення $2,5 \times 10^8$ спор певного штаму *B. subtilis* курчатам значно підвищилася резистентність птиці до інфікування тварин серотипом *E. coli* O78:K80 та визначено, що відповідний штам бацил здатен інгібувати колонізацію та персистенцію бактерій *Salmonella enteritidis* та *Clostridium perfringens* у ШКТ птиці [29].

Введення пробіотичних штамів також впливає на фекальну мікрофлору. Встановлено, що у поросят після застосування разом із кормом *Bacillus coagulans* (10^{11} КУО/г корму) на фоні зростання кількості аеробних і анаеробних спортивірних бактерій у фекаліях знизився вміст лактококів, ентерококів і представників родини *Enterobacteriaceae*. Відмічено [21], що у фекаліях свиней, які споживали корм зі штамом *B. subtilis* MA 139, збільшилась кількість лактобацил та суттєво знизилась *E. coli*.

Більшість бактерій родини *Bacillus* не містить у складі ДНК генів резистентності до антибіотиків, тому вони переважно чутливі до антимікробних препаратів. Виняток становлять представники виду *B. clausii*, які є резистентними до еритроміцину, цефалоспоринів, циклосерину, канаміцину, амікацину, тетрациклінів, хлорафеніколу та неоміцину [25]. Представники роду *Bacillus* здебільшого характеризуються природною резистентністю до поліміксинів, бацитрацину, граміцидину, які діють на цитоплазматичну мембрану, що захищена у бацил товстим шаром пептидоглікану [21].

Для бактерій роду *Bacillus* також є характерною імуностимулювальна дія. Спори *Bacillus* spp. стимулюють зростання кількості цитокінів ІЛ-2 та зменшується рівень ІЛ-10, який інгібує синтез прозапальних цитокінів. До того ж, у сироватці крові підвищується рівень IgG та IgA антитіл [32; 33]. Наявність антитіл вказує на активацію Th1 відповіді, яка є важливою для утворення цитотоксичних Т-лімфоцитів, руйнації внутрішньоклітинних мікроорганізмів та презентації антигенів комплексом гістосумісності класу I. Встановлено, що у лімфоїдній тканині кишковика та вторинних лімфатичних органах внаслідок введення ізолятів *B. subtilis* чи *B. pumilus* синтезувалися IFN- γ та TNF- α [31]. Нещодавно було показано, що пероральне засто-

сування штамів *B. subtilis* викликає індукцію синтезу інтерферону мононуклеарними клітинами периферійної крові, що стимулює активність макрофагів та натуральних кілерів. Не лише спори, а й пептидоглікан клітинної стінки вегетативних форм бактерій (особливо *B. firmus*) відіграють важливу роль у активації імунітету. Наприклад, деякі штами *B. clausii* індукують проліферацію CD4⁺ Т-клітин [29].

Представники роду *Bacillus* впливають на імунну систему безхребетних тварин через гуморальну (аглютиніни, цитокінподібні фактори, фактори згортання крові) та клітинну (фагоцитоз, профенолоксидазна система) ланки. Так, у комерційних видів креветок внаслідок застосування штаму *Bacillus* S1.1 збільшувалася активність ензиму з антимікробними властивостями – фенолоксидази та фагоцитарна активність гемоцитів [29].

Окрім зазначених пробіотичних властивостей, бактерії роду *Bacillus* є технологічними у виробництві. Бацили швидко ростуть на поживних середовищах та вступають у логарифмічну фазу росту на 18-24-ту годину культивування. Середовища для їх культивування є доволі дешевими та простими. Наприклад, оптимальним для росту *Bacillus subtilis* R14 є рідке середовище такого складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0, глюкоза – 10.0, KH_2PO_4 – 13.6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2. До того ж, ліофільно висушені культури спроможні зберігати життєздатність протягом трьох років [34].

Отже, головними перевагами бактерій роду *Bacillus* над іншими пробіотичними культурами є те, що вони володіють високою антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, технологічні у виробництві, стабільні при зберіганні, екологічно безпечні [18; 29; 32].

Перспективи використання спортивірних бактерій у ветеринарії

Технологічний процес створення пробіотиків на основі *Bacillus* spp. простий і не потребує значних витрат [35]. Сьогодні відомі шляхи підвищення ефективності пробіотиків із використанням додаткових добавок (лактиту, лактулози, інуліну), що значно поліпшують ріст пробіотичних штамів, за рахунок збільшення ферментативної активності бактерій (целюлозолітичної, ліпазної та ін.). Ще одним удосконаленням ефективності пробіотиків є створення біоплівки та іммобілізація бактеріальних клітин на сорбенті. Наприклад, лікарський засіб Ферм-КМ, до складу якого входять штами *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis*, а також комплекс молочнокислих

бактерій, пребіотик (пектин), біотрансформований фітосорбент і продукти твердофазного зброджування рослинного субстрату є високоефективним у тваринництві [19].

Нині вже створено низку препаратів на основі штамів *Bacillus* spp., які широко використовуються у ветеринарії для профілактики дисбактеріозів ШКТ та покращення загального стану тварин (таблиця). Окрім цього, можливе застосування відповідних бактерій у аквакультури, наприклад препарат BaoZyme-Aqua (Тайвань), до складу якого входять штами *B. subtilis* Wu-S і Wu-T з концентрацією клітин 1×10^8 КУО/г, використовується для підвищення темпів росту та захисту від патогенів промислових видів креветок [25].

Наприклад, за дії препарату Біоплюс 2 Б (*B. subtilis*) в організмі великої рогатої худоби відбувається збільшення активності супероксид дисмутази як у плазмі крові, так і в еритроцитах у межах 50 %, концентрації білкових SH-груп – на 70 % порівняно з контролем. Згаданий препарат сприяє зростанню фагоцитарної активності макрофагів на 12 %, індексу завершеності фагоцитозу – на 15 %, елімінуючої здатності крові – на 19 % та значення інтенсивності поглинальної функції фагоцитів – на 11 % порівняно з контролем [22].

Відомо, що під час використання препарату Рацифлог підвищується рівень здоров'я у свиноматок та приплоду. Так, у поросят, яким давали 85 г препарату на тонну корму, знизилася частота виникнення діарей, рівень смертності, нормалізувалися показники біоконверсії корму [25]. Препарат Тойцерин є ефективним щодо лікування діареї у поросят групи відлучення, етіологічним чинником якої є *E. coli*.

Отже, деякі ізоляти *Bacillus* spp. володіють низкою пробіотичних властивостей, що дає можливість розглядати їх як перспективний об'єкт для створення нових пробіотичних препаратів з високою антагоністичною активністю щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, імуномодельною активністю, безпечністю, здатністю продукувати значну кількість метаболітів та покращувати травлення.

Висновки

Таким чином, нами проведено аналіз даних літератури щодо можливих шляхів синтезу каротиноїдних пігментів бактеріями роду *Bacillus*: 4,4'-діапокаротиноїдів (C_{30}); апо-8'-каротиноїдів (C_{30}); C_{40} каротиноїдів. Головними перевагами споротвірних бактерій над традиційними пробіотичними мікроорганізмами є технологічність, безпечність, стабільність під час зберігання, високий рівень антагоністичної активності щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Каротинсинтезувальні штами *Bacillus* spp. є перспективним об'єктом дослідження для створення на їх основі препаратів, які б поєднували властивості кормової добавки та пробіотика, оскільки більшість представників роду *Bacillus* відповідають вимогам, висунутим до пробіотичних культур. Запропонована стаття є теоретичним підґрунтям для вивчення каротинсинтезувальної здатності та пробіотичних властивостей пігментованих штамів *Bacillus* spp., що зберігаються у музеї відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Таблиця. Пробіотичні препарати на основі бацил у ветеринарії

Назва препарату	Тварини, до яких застосовують пробіотики	Виробник препарату	Склад пробіотичного препарату
AlCare	Свині	Австралія	<i>B. licheniformis</i> 10^9 - 10^{10} спор/кг
BioGrow	Кури, свині, жуйні	Англія	<i>B. licheniformis</i> та <i>B. subtilis</i> $1,6 \times 10^9$ КУО/г
BioPlus 2B	Свині, кури, індики	Данія	<i>B. licheniformis</i> (DSM5749) та <i>B. subtilis</i> (DSM5750) $1,6 \times 10^9$ КУО/г
Esporafeed Plus	Свині	Іспанія	<i>B. cereus</i> (CECT 953) 1×10^9 КУО/г
Lactopure	Кури, свині, жуйні	Індія	<i>Lactobacillus sporogenes</i> та <i>B. coagulans</i> .
Neoferm BS 10	Кури, свині, жуйні	Франція	<i>B. clausii</i> (CNCM MA23/3V та CNCM MA66/4M)
Toyocerin	Кури, свині, жуйні, кролі, риби	Японія	<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i> (NCIMB-40112/ CNCM-1012) 1×10^{10} КУО/г
Raciflog C10	Кури, свині, жуйні, кролі	Нідерланди	<i>B. cereus</i> CIP5832 (ATCC 14893) 2×10^8 - 5×10^9 КУО/г

Джерело: [25].

Список літератури

1. Carotenoids present in halotolerant *Bacillus* sporeformers / L. H. Duc, P. D. Fraser, N. K. Tam et al. // FEMS Microbiol Lett. – 2006. – № 255. – P. 215–224.
2. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers / L. Perez-Fons, S. Steiger, R. Khaneja et al. // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – № 1811. – P. 177–185.
3. Carotenoids found in *Bacillus* / R. Khaneja, L. Perez-Fons, S. Fakhry et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – № 108. – P. 1889–1902.
4. Godinho A. Carotenes produced by alkaliphilic orange-pigmented strains of *Microbacterium arborescence* – AGSB isolated from coastal sand dunes / A. Godinho, S. Bhosle // Indian journal of marine science. – 2008. – Vol. 37. – P. 307–312.
5. Cheng Q. Recent patents on carotenoid production in microbes / Q. Cheng // Recent patent biotechnology. – 2007. – Vol. 1. – P. 202–211.
6. Delgado-Vargas F. Natural Pigments: carotenoids, anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability / F. Delgado-Vargas, A.R. Jiménez, O. Paredes-López // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2000. – Vol. 40. – P. 173–289.
7. Carbohydrate-active enzymes from pigmented *Bacilli*: a genomic approach to assess carbohydrate utilization and degradation / N. Manzo, E. D'Apuzzo, P. M Coutinho et al. // BMC Microbiol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1–10.
8. Misava N. Comprehensive natural products II / N. Misava // Chemistry and Biology. – 2010. – Vol. 1. – P. 733–753.
9. Glycosyl carotenoids from marine spore-forming *Bacillus* sp. strains are readily bioaccessible and bioavailable / C. Sy, B. Gleize, S. Chamot et al. // Food Research International. – 2013. – Vol. 51. – P. 914–923.
10. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools / A. Das, S. Yoon, S. Lee et al. // Journal of Applied Microbiol Biotechnology. – 2007. – Vol. 77. – P. 505–512.
11. On the structure and function of the phytoene desaturase CrtI from *Pantoea ananatis*, a membrane-peripheral and fad-dependent oxidase/isomerase / P. Schaub, Q. Yu, S. Gemmecker et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. 1–15.
12. Perez-Fons L Analysis of diapocarotenoids found in pigmented *Bacillus* species / L. Perez-Fons, P. D. Fraser // Methods in Molecular Biology. – 2012. – Vol. 892. – P. 335–345.
13. Misawa N. Carotenoid β -ring hydroxylase and ketolase from marine bacteria—promiscuous enzymes for synthesizing functional xanthophylls / N. Misawa // Marine drugs. – 2011. – Vol. 9. – P. 757–771.
14. Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) / H. Z. Far, C. B. Saad, H. M. Daud et al. // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – P. 3369–3376.
15. Hill J. E. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens / J. E. Hill, J. C. Baiano, A. C. Barnes // Journal of fish diseases. – 2009. – Vol. 1. – P. 1–10.
16. Selvakumar D. Studies on photosynthetic bacterial diversity from retting areas of Murukkumpuzha along Kerala Coast, India / D. Selvakumar, K. Dhevendaran // Middle East journal of scientific research. – 2011. – Vol. 7. – P. 937–942.
17. Thin-Layer Chromatography ; 4th edition / [ed. by B. Fried, J. Sherma]. – Marcel Dekker, 2005. – 432 p.
18. Nithya V. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources / V. Nithya, P. M. Halami // Annals of Microbiology. – 2013. – Vol. 63. – P. 129–137.
19. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин и др. // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1. – С. 184–193.
20. Скрыпник И. Н. Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике / И. Н. Скрыпник, А. С. Маслова // Сучасна гастроентерологія. – 2009. – № 3. – С. 81–91.
21. Похиленко В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В. Д. Похиленко, В. В. Перельгин // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2 – С. 32–33.
22. Самсоненко Д. О. Пробиотик біоплюс 2-б в раціоні телят / Д. О. Самсоненко, Н. О. Авраменко // Вісник СНАУ. – 2010. – № 3. – С. 116–120.
23. Details on probiotics [Електронувбq ресурс]. – Режим доступу: http://www.customprobiotics.com/about_probiotics_continued.htm. – Назва з екрана.
24. Смірнов В. В. Адгезивні властивості бактерій роду *Bacillus*, як компонентів пробіотику / В. В. Смірнов, І. В. Косик // Мікробіологічний журнал. – 1997. – Т. 59. – С. 36–43.
25. Cutting S. M. *Bacillus* probiotics / S. M Cutting // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 28 – P. 214–220.
26. *Bacillus* strains as feed additives: In vitro evaluation of its potential probiotic properties / J. Lee, I. Park, Y. Cho et al. // Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. – 2012. – Vol. 25. – P. 577–585.
27. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract / T.M. Barbosa, C.R. Serra, R.M. Ragione et al. // Applied and environmental microbiology. – 2005. – Vol. 71. – P. 968–978.
28. The benefits of using bacillus as a probiotic / K. Y. Hwang, J. H. Cho, J. Y. Lee et al. // Journal of animal and veterinary advances. – 2012. – Vol. 18. – P. 3457–4362.
29. Hong H. A. The use of bacterial spore formers as probiotics / H. A. Hong, L. H. Duc, S. M. Cutting // FEMS Microbiology Reviews. – 2005. – Vol. 29. – P. 813–835.
30. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances / S. C. Ng, A. L. Hart, M. A. Kamm et al. // Inflammatory bowel diseases. – 2009. – Vol. 15. – P. 300–310.
31. Boirivant M. The mechanism of action of probiotics / M. Boirivant, W. Strober // Current Opinion in Gastroenterology. – 2007. – Vol. 23. – P. 679–692.
32. Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of preruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters / J. B. Riddell, A. J. Gallegos, D. L. Harmon et al. // International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. – 2010. – Vol. 8. – P. 78–85.
33. Application of probiotic (*Bacillus subtilis*) to enhance immunity, antioxidation, digestive enzymes activity and hematological profile of shaoxing duck / I. R. Rajput, W. F. Li, Y. L. Li. et al. // Pak veterinary journal. – 2013. – Vol. 31. – P. 69–72.
34. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14 / A. L. Carvalho, F. H. Corrêa de Oliveira, R. R. Mariano et al. // Brazilian archives of biology and technology. – 2010. – Vol. 53 – P. 643–652.
35. The potential of probiotics: a review / C. R. Soccol, L.P. Vandenberghe, M.R. Spier et al. // Food technology biotechnology. – 2010. – Vol. 48. – P. 413–434.

O. Nechypurenko, L. Avdeeva, M. Kharkhota

CAROTINE SYNTHESIZING ABILITIES AND PROBIOTIC PROPERTIES OF BACTERIA OF BACILLUS GENUS

It was studied the literature data of the ability of bacteria of the genus Bacillus to form red and yellow colors' pigments, analyzed their structure and biochemical routes of synthesis. It was investigated that the vast majority of pigments produced by Bacillus spp. relates to compounds of carotenoids nature. Also was evaluated the probiotic abilities of Bacillus strains and proposed the opportunity to further use of carotene-producing strains in the veterinary.

Keywords: carotenoid pigments, Bacillus strains, carotenoids, probiotics.

Матеріал надійшов 20.06.2013

УДК 576.354+575.616.697

Пилип Л. Я., Білько Н. М.

АНАЛІЗ ЧАСТОТ УТВОРЕННЯ НЕЗБАЛАНСОВАНИХ ЗА ХРОМОСОМНИМ НАБОРОМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ У НОСІЇВ ТРАНСЛОКАЦІЙ

Проведено аналіз частот утворення незбалансованих гамет у носіїв реципрокних та робертсонівських транслокацій методом флуоресцентної гібридизації in situ на деконденсованих інтерфазних ядрах сперматозоїдів із використанням комбінацій флуоресцентних зондів, що дозволяли ідентифікувати усі варіанти сегрегації хромосом. У носіїв робертсонівських транслокацій виявлено гомогенну картину сегрегації хромосом з переважанням альтернативного типу сегрегації з утворенням нормальних / збалансованих гамет. Середня частота утворення незбалансованих гамет становила $20,4 \pm 8,3$ % (від 5,8 % до 32 %). У носіїв реципрокних транслокацій зареєстровано індивідуальне варіювання частот утворення незбалансованих гамет (від 49 % до 68,1 %, в середньому $58,5 \pm 6,5$ %) залежно від хромосом і точок розриву та сполучення, що залучені до перебудови. Отримані результати розглянуті в контексті їх використання для медико-генетичного консультування носіїв збалансованих транслокацій.

Ключові слова: реципрокні транслокації, робертсонівські транслокації, сегрегація хромосом, незбалансовані гамети.

Вступ

Хромосомні аномалії є одним із етіологічних чинників безпліддя. Збалансовані робертсонівські та реципрокні транслокації – найпоширеніші структурні перебудови хромосом, які виявляють у новонароджених із частотою 1,23:1000 та 1:625 відповідно [1]. Частота таких перебудов у пацієнтів із безпліддям вища і становить близько 1–3 %, залежно від особливостей досліджуваної групи [2; 3]. Носійство збалансованих хро-

мосомних перебудов, як правило, не має фенотипового прояву, однак призводить до підвищеного ризику невиношування та народження дітей із хромосомною патологією через утворення незбалансованих гамет. Кон'югація дериватних хромосом та їхніх гомологів у мейозі забезпечується за рахунок утворення специфічних структур – тривалентів у носіїв робертсонівських транслокацій та тетравалентів у носіїв реципрокних транслокацій [4]. Тип анафазного розходження три- та тетравалентів визначає утво-