



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99450** (13) **C2**  
(51) МПК**A61K 35/74** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12R 1/07** (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2009 06956**
- (22) Дата подання заявки: **08.10.2007**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.08.2012**
- (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **P200600038**
- (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **08.12.2006**
- (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EE**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.11.2009, Бюл.№ 21**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.08.2012, Бюл.№ 16**
- (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ **PCT/EE2007/000021, 08.10.2007**
- (72) Винахідник(и):  
**Йогі Ерік (EE),  
Нурк Аллан (EE),  
Суїтсо Індрек (EE),  
Талпсеп Ене (EE),  
Наабер Пауль (EE),  
Льоівукене Кріста (EE)**
- (73) Власник(и):  
**ТАРТУ ЮЛІКУЛ (ЮНІВЕРСИТЕТ ОФ ТАРТУ),  
Ulikooli 18, EE50090 Tartu, Estonia (EE)**
- (74) Представник:  
**Льгова Майя Миколаївна, реєстр. №12**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
SUITSO ET AL: "P1763 Bacillus smithii TBM12 spores as a potential competitive exclusion agent against Salmonella enteritidis" INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS, AMSTERDAM, NL, vol. 29, March 2007, page S501.  
JOGI E., TALPESP E.: "Bacillus smithii strain TBM12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence"[Online] 25 October 2006 (2006-10-25), Retrieved from the Internet: URL: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+\(\[emblidacc-id:EF010852\]>embl\) \[emb l-acc:EF010852\]+-vn+2+-noSession\)](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+([emblidacc-id:EF010852]>embl) [emb l-acc:EF010852]+-vn+2+-noSession)).  
MIYASHITA M., NAKAGAWA Y., SUZUKI K.: "Bacillus smithii gene for 16S rRNA, partial sequence"[Online] 5 September 2006 (2006-09-05), Retrieved from the Internet: URL: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+\(\[emblidacc-id:AB271749\]>embl\) \[emb l-acc:AB271749\]+-vn+2+-noSession\)](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+([emblidacc-id:AB271749]>embl) [emb l-acc:AB271749]+-vn+2+-noSession)).  
SCHELDEMAN PATSY ET AL: "Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY MAR 2005, vol. 71, no. 3, March 2005 (2005-03), - March 2005 (2005-03) pages 1480-1494, & [Online] 2005, Retrieved from the Internet: URL: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+\(\[emblidacc-id:AY373319\]>embl\) \[emb l-acc:AY373319\]+-vn+2+-noSession\)](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+([emblidacc-id:AY373319]>embl) [emb l-acc:AY373319]+-vn+2+-noSession)).  
RAINEY F A ET AL: "THE PHYLOGENETIC DIVERSITY OF THERMOPHILIC MEMBERS OF THE GENUS BACILLUS AS REVEALED BY 16S RDNA ANALYSIS" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, 1994, pages 205-211, & [Online] 14 May 1997 (1997-05-14), Retrieved from the Internet: URL: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+\(\[emblidacc-id:Z26935\]>embl\) \[emb l-acc:Z26935\]+-vn+2+-noSession\)](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wg etz?-e+([emblidacc-id:Z26935]>embl) [emb l-acc:Z26935]+-vn+2+-noSession)).

(54) ШТАМ МІКРООРГАНІЗМУ BACILLUS SMITHII TBM12 MSCL P737 ТА ЙОГО ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЕКВІВАЛЕНТИ (ЕНДОСПОРИ, МУТАНТИ, ПОКОЛІННЯ, ПОХІДНІ) ДЛЯ ЗАХИСТУ ВІД ДІЇ ЕНТЕРОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

UA 99450 C2

---

**(57)** Реферат:

Винахід належить до штаму мікроорганізму *Bacillus Smithii* TBM12 MSCL P737 та його функціональних еквівалентів (ендоспор, мутантів, поколінь, похідних) для захисту від дії ентеропатогенних бактерій та застосування вказаного вище штаму як харчової та/або кормової добавки, а також як антибактеріального компонента пробіотичних композицій.

## Галузь винаходу

Винахід належить до галузі біотехнології і стосується пробіотичного бактерійного штаму, який може бути використаний для запобігання бактерійним інфекціям шлунково-кишкового тракту хребетних тварин і для стимулювання їхньої імунної системи.

## 5 Попередній рівень техніки

Ідея застосування антагонізму між бактеріями проти патогенів бере початок з часів Лістера (Lister) та Флемінга (Fleming). Введення живих мікробів для заселення шлунково-кишкового тракту для стимулювання імунної системи або для антибактерійних цілей є найсвіжішою ідеєю. Введені перорально живі організми, які приносять користь організму, який їх споживає, називають пробіотиками [Martins, F.S. та ін. (2005). Скринінг дріжджів як пробіотика на основі їхньої здатності заселяти шлунково-кишковий тракт та захищати проти ентеропатогенного зараження у мишей (Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice). J. Gen. Appl. Microbiol. 51: 83-92). Традиційно, вони походять з роду *Lactobacillus*.

15 На жаль, успішному застосуванню лактобацил як пробіотиків перешкоджає масова загибель мікробів внаслідок дії кислоти шлункового соку та жовчі (Spinosa, MLR. та ін. (2002) Про долю проковтнутих спор *Bacillus* (On the fate of ingested *Bacillus* spores). Res. Microbiol. 151: 361-368). Проте, у разі застосування спор замість вегетативних клітин показник їх виживання є значно вищим. У той же час, препарати, введені у вигляді спор, не є менш ефективними, ніж  
20 препарати, введені у вегетативній формі. Навпаки, можливість зберігати спори впродовж необмеженого періоду часу є перевагою, і тому введення спор стало альтернативою застосуванню антибіотиків у сільському господарстві (Wolken, W.A.M. та ін. (2003) Що можуть для нас зробити спори? (What can spores do for us?) Тенденції в біотехнології (Trends in Biotechnology). 21: 338-345). Спори з представників роду бацил (*Bacillus*), таких як *B. clausii*, *B. subtilis*, *B. pumilus* та *B. cereus*, застосовують найбільше для профілактичних і терапевтичних  
25 цілей (Duc, L.H. та ін. (2004). Характеристика пробіотиків *Bacillus*, доступних для застосування людиною (Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use). Appl. Environ Microbiol. 70: 2161-2171).

30 Що викликало інтерес, так це можливість застосування комбінації ендоспор *Bacillus* sp. та антибіотиків для боротьби з інфекціями. Ця практика є звичною на Сході та у Південній Азії, оскільки це знижує ускладнення від лікування антибіотиками.

Як правило, ендоспори, що їх використовують, є також стійкими до відповідного антибіотика. Недоліком такої методики є поширення генів стійкості до антибіотиків.

Найближчий аналог цього винаходу стосується спорогенної бактерії *Bacillus coagulans*, яку  
35 застосовують як пробіотичну добавку у кормах для тварин (WO 93/14187, Adami A. та ін., 1993), та комбінації пробіотичних неспорогенних мікроорганізмів та спор *Bacillus subtilis* та/або *Bacillus clausii* для фармацевтичного, дієтичного та/або нутрицевтичного застосування (EP1405641A2, Dondi G., 2004). Ці експерименти звичайно є непрямыми: пробіотичний ефект досліджують примітивним способом в умовах *in vitro* (EP 1107772, Farmer, Sean. Пробіотичні бактерії, що  
40 виробляють молочну кислоту, та їх застосування (Probiotic, lactic acid-producing bacteria and uses thereof) 1999) або просто вимірюють позитивний приріст досліджуваних тварин (Adami, A., та ін. (1993) Штам бактерій виду *Bacillus coagulans*: його застосування як пробіотичного агента (A bacterial strain of the species *Bacillus coagulans*: its use as a probiotic agent). PCT/EP93/0030).

## Суть винаходу

45 Об'єктами цього винаходу є штам мікроорганізму *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 та його функціональні еквіваленти (ендоспори, мутанти, покоління, похідні) та застосування вказаного штаму як пробіотичного агента для антибактерійних цілей, для заселення шлунково-кишкового тракту та для стимулювання імунної системи, а також його застосування як харчової добавки та пробіотичної композиції.

50 Об'єкт цього винаходу - *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 - був відокремлений з фекалій здорового дорослого чоловіка. Одержаний штам був відокремлений у процесі описування мікробіологічного складу фекалій, в якому досліджували існування термофільного виду *Bacillus* sp. Зразок свіжих фекалій розбавили десятикратно у 0,9 %-ному розчині NaCl та суспендували. Одержану суспензію нагрівали при температурі 85 °C впродовж 15 хвилин для видалення  
55 вегетативних клітин. Нагрітий зразок культивували у середовищі з композицією, описаною у (Michelson, T.; Kask, K.; Jõgi, E.; Talpsep, E.; Suitso, I.; Nurk, A. (2006). Продукент 1 (+)-молочної кислоти *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 та його порівняння з *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. Ферментна та мікробна техніка. (1(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. Enzyme and Microbial Tech)). Планшети з інокуляційною дозою 100 мкл інкубували при температурі 55 °C  
60

впродовж 24 годин. З одержаних колоній приготували суспензію (0,2 % Tween80) різного розведення, і шляхом її культивування у вказаному вище середовищі одержала очищену чисту культуру *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737.

5 Культурні та морфологічні характеристики. Колонії штаму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 мають прямий край, випуклу поверхню і дуже в'язку консистенцію. Діаметр безбарвних (без пігменту) колоній становить приблизно 5 мм. Грампозитивні паличкоподібні бактерії звичайно не агреговані, але в разі стресу також утворюють ланцюги. Клітини є рухомими та утворюють субтермінальні ендоспори.

10 Фізіологічні та біохімічні характеристики. Штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 вирощують на моносахаридах, таких як глюкоза, галактоза, фруктоза, ксилоза та арабіноза; на дисахаридах, таких як цукроза, мальтоза, лактоза; та на полісахаридах, таких як крохмаль. Щодо типу метаболізму, штам є аеротолерантною молочнокислою бактерією: вона ферментує вуглеводні на молочну кислоту без вивільнення вуглекислоти. Внаслідок існування каталази він є толерантним до кисню.

15 Температура вирощування. Штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 росте при широкому діапазоні температур від кімнатної температури до 55 °C. 40 хвилин нагрівання при температурі 85 °C не завдає шкоди ендоспорам і не впливає на їх пророщування.

20 Ідентифікація. Штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 ідентифікували на підставі генної послідовності 16S rPHK (інвентарний номер GenBank EF010852). Найближчими спорідненими формами були *Bacillus smithii* R-71170 з 99 % подібністю, *Bacillus smithii* JCM9076 з 96 % подібністю та *Bacillus eolicus* 4-1T з 95 % подібністю.

З 19.10.2006 штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 депонований у Колекції штамів мікробів Латвії (MSCL) під номером P737.

25 *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 надає цікаву можливість, оскільки завдяки його типу метаболізму штам є стійким до метронідазолу. Це дозволяє використовувати штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 без додаткових маркерів стійкості у лікуванні інфекцій шлунково-кишкового тракту, індукованих *Clostridium difficile*, оскільки згаданий вище *Clostridium difficile* є чутливим до метронідазолу і цей антибіотик звичайно використовують у лікуванні. На додаток до цього антибіотика, у принципі можна використовувати інші антибіотики разом зі штамом *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737.

Штам відповідно до цього винаходу застосовують для таких цілей.

Заселення шлунково-кишкового тракту для антибактерійних цілей.

35 *Clostridium difficile*, що є частиною нормальної мікрофлори людини, є звичайно нешкідливим. Однак, він може спричиняти псевдо-мембранний коліт після лікування антибіотиками, що знижує баланс мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Для уникнення проліферації *Clostridium difficile* та подальшого захворювання шлунково-кишковий тракт має бути превентивно заселений пробіотичними бактеріями, такими як штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737, які можуть перенести лікування антибіотиками у вигляді ендоспор.

40 Заселення шлунково-кишкового тракту для забезпечення стійкості до захворювання та запобігання бактерійним інфекціям.

Інфекція *Salmonella* звичайно є харчовою. Бактерії, які потрапили до шлунково-кишкового тракту, прикріплюються до стінки кишечника, проникають у неї та переносяться по всьому тілу кров'ю. У печінці бактерії відтворюються і після цього повертаються до кишечника, де вони спричиняють діарею. Хворі домашні тварини та птахи можуть інфікувати людей через яйця та м'ясо.

45 Хоча звичайно хвороба не становить небезпеки для життя людини (лише 2 % інфікованих людей потребують лікування антибіотиками), доцільніше превентивно заселяти шлунково-кишковий тракт людини, домашніх тварин та птахів штамом *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737, аніж хворіти.

50 Застосування з метою стимулювання імунної системи.

Тримання тварин у гігієнічних умовах знижує ризик патогенних інфекцій. На жаль, це також має негативний побічний ефект: імунна система звикає до стерильних умов, і навіть випадковий контакт зі звичайно непатогенним мікроорганізмом може спричинити хворобу. Для уникнення цього, імунну систему необхідно постійно піддавати впливу імуногенів.

55 Введення ендоспор пробіотичних бактерій *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 дозволяє підтримувати імунну систему у постійній готовності до боротьби з патогенами.

Застосування як харчової добавки.

60 Штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 може бути використаний як харчова добавка у вигляді як вегетативних клітин, так і ендоспор. Вегетативні клітини мають бути ліофілізовані перед введенням. Перевагу надають введенню штаму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 у

вигляді ендоспор, оскільки це дозволяє досягати максимального пробіотичного ефекту та, у той же час, ендоспори можна легко зберігати. Перевагу надають застосуванню ендоспор у вигляді сухих препаратів.

У такому випадку, по суті, немає жодних обмежень також щодо наповнювачів препарату, оскільки клітини в неактивній формі, такі як ендоспори, витримують екстремальні умови (висока концентрація цукру, низький рівень pH, тривале зберігання, консерванти).

Застосування як компонента пробіотичних композицій.

Вегетативні клітини або ендоспори *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 можуть бути використані як компонент у пробіотичних композиціях. Функцією наповнювачів є полегшення виробництва, зберігання та введення, а також підтримання пробіотичного ефекту *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737.

Зовнішнє застосування для антибактерійних цілей.

Антагонізм між бактеріями може бути використаний для створення гігієнічних умов на зовнішній поверхні організму-хазяїна від шкідливих бактерій. Примітним є той факт, що на відміну від хімічної або фізичної стерилізації, що не вибірково руйнує усю мікрофлору, антагонізм між бактеріями функціонує вибірково. Це означає, що можна пригнічувати потенційних патогенів без порушення нормальної мікрофлори.

Короткий опис креслень

Фіг. 1. Число (■) *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 ( $n=5$ ) зі стандартним відхиленням у фекаліях хом'яків (КУО/г) після лікування антибіотиками (ампіцилін 3 мг/хом'як), інокуляції *Clostridium difficile* VPI 10463 ( $10^4$  клітин) та лікування пробіотичним штамом *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 ( $1 \times 10^8$  ендоспор; 2-ї, 3-ї та 4-тої доби).

Фіг. 2. Курс інфікування *Salmonella* у мишей. Інфікування патогеном *Salmonella Enteritidis* var. у мишей, не заселених (■) та заселених (■) ендоспорами *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737, виявляли у зразках фекалій, печінки або селезінки, культивованих на планшеті XLD відповідно до КУО.

Фіг. 3. Середні значення кількості *Clostridium difficile* VPI 10463 зі стандартною похибкою з фекалій досліджуваних тварин (КУО/г). Миші, що одержували комбіноване лікування метронідазолом + *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 ( $10^8$ ) ( $n=5$ ) (■), та миші, яких лікували лише метронідазолом (■). Значення р 2-ї та 4-ї доби вказує на статистичну значимість різниці.

Опис втілення

1. Заселення шлунково-кишкового тракту для антибактерійних цілей.

Для демонстрування в експерименті в умовах *in vivo* здатності *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 успішно заселяти шлунково-кишковий тракт хребетних тварин ми використовували хом'яків (*Mesocricetus auratus*) як досліджуваних тварин.

Мікрофлора нормальних хом'яків була погіршена 3 мг ампіциліну, введеного внутрішньошлунково. Через 24 години досліджуваних тварин інфікували клітинами ( $\approx 10^5$ ) штамом *Clostridium difficile* VPI 10463. Половині хом'яків ввели ендоспори *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 ( $\approx 10^8$ ) за дві години до інфікування. Додатково ту саму дозу ввели тій самій групі хом'яків через 24 і 48 годин. Хом'яки, яким не вводили і, відповідно, яких не заселяли штамом *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737, померли через 48 годин, в той час як заселені хом'яки вижили. *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 продовжували заселяти шлунково-кишковий тракт впродовж одного місяця після введення (Фіг. 1). Результат є надзвичайно цінним, оскільки хом'яки є особливо чутливими до токсину *Clostridium difficile*, і ця бактерія (*Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737) не є частиною їхньої нормальної мікрофлори.

Цим експериментом ми показали, що *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 здатен заселяти шлунково-кишковий тракт тривалий час і тому запобігати інфекції *Clostridium difficile* у хом'яків.

2. Заселення шлунково-кишкового тракту для забезпечення стійкості до хвороб та запобігання бактерійним інфекціям

Для стійкого заселення шлунково-кишкового тракту мишей (*Mus musculus* BALB/c) три дози ( $\approx 10^8$ ) ендоспор пробіотичної бактерії *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 вводили внутрішньошлунково кожні 24 години. Третього дня після останньої дози досліджуваних тварин інокулювали var. клітинами *Salmonella Enteritidis* ( $\approx 10^6$ ). Через два тижні можна було інокулювати клітини *Salmonella Enteritidis* зі зразків печінки, селезінки та фекалій лише 40 % досліджуваних тварин. 60 % досліджуваних тварин не були інфіковані *Salmonella*. Контрольну групу не заселяли штамом *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737 і ввели лише var. клітини *Salmonella Enteritidis* ( $\approx 10^6$ ). Всі ці миші були інфіковані. Перебіг хвороби був значно уповільнений: інфіковані миші, які були заселені штамом *Bacillus smithii* TBM12 MSCL P737, проявляли симптоми лише на 10-й день після інфікування, в той час як клітини *Salmonella Enteritidis* було можливо виявити у фекаліях незаселених мишей вже першого дня після

інфікування. Описаний вище експеримент проілюстрований на Фіг. 2. В результаті уповільненого перебігу хвороби можна вживати заходів для боротьби з інфекцією та полегшення патологічного стану. На підставі цих експериментів можна зробити висновок, що застосування штаму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 як пробіотичного агента дозволяє

запобігти інфікуванню *Salmonella* та уповільнити перебіг хвороби.

### 3. Застосування з метою стимулювання імунної системи

Для стимулювання імунної системи мишей вводили три дози ( $\approx 10^8$ ) ендоспор штаму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 внутрішньошлунково кожні 24 години. Через чотири години після останньої дози досліджуваних тварин інфікували ваг. клітинами *Salmonella Enteritidis* ( $\approx 10^6$ ). В результаті попереднього стимулювання імунної системи досліджувані тварини не були інфіковані *Salmonella*. Вперше можна було виявити клітини *Salmonella Enteritidis* лише на 10-й день після інюкуляції та у фекаліях лише 10 % досліджуваних тварин. Загалом, лише 40 % досліджуваних тварин, заселених ендоспорами *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737, були інфіковані *Salmonella*. У контрольної групи імунну систему мишей не стимулювали ендоспорами штаму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 і ввели лише ваг. клітини *Salmonella Enteritidis* ( $\approx 10^6$ ). 100 % цих мишей були інфіковані. Перебіг хвороби також прискорився: можна було виявити клітини *Salmonella Enteritidis* в 30 % фекалій незаселених мишей вже першого дня після інюкуляції.

Відповідно, повторне введення ендоспор штаму пробіотичних бактерій *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 достатньо стимулює імунну систему для забезпечення значного захисту проти інфекції *Salmonella*.

### 4. Застосування як харчової та/або кормової добавки

Мишей та хом'яків годували ендоспорами *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 у різних концентраціях і спостерігали їхню дію на досліджуваних тварин. Будь-якого шкідливого ефекту виявлено не було. В той же час, очевидними були позитивні результати: мікрофлора досліджуваних тварин, яка зазнала змін в результаті лікування антибіотиками, могла бути відновлена і досліджувані тварини були набагато стійкішими до бактерійних інфекцій шлунково-кишкового тракту, оскільки перед тим ендоспори *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 стимулювали їхню імунну систему.

Відповідно, штам пробіотичних бактерій *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 є придатним для застосування як харчової та/або кормової добавки.

### 5. Застосування як компонента пробіотичних композицій

Для введення мишам та хом'якам ендоспор *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 з останнього та води приготували пробіотичну композицію, яку деіонізували зворотним осмосом. Пробіотична композиція містила від  $10^6$  до  $10^{10}$  ендоспор на 1 мл розчину. Це значно полегшило зберігання та введення. В результаті введення композиції, що містила штам *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737, стійкість досліджуваних тварин до бактерійних інфекцій шлунково-кишкового тракту збільшилась. Відповідно, штам пробіотичних бактерій *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 є придатним для застосування як компонента пробіотичних композицій.

### 6. Зовнішнє застосування для антибактерійних цілей

Для демонстрування антибіозу між *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 та іншими бактеріями були проведені експерименти в умовах *in vitro*. Спочатку клітини *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 вирощували у планшетах PDA (Fluka) при температурі 55 °C, а потім бактерії різних видів культивували по радіусу навколо них. Експеримент проводили з *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella Typhimurium* та *Salmonella Enteritidis*. Після цього планшети інкубували при температурі 30 °C. 75 % видів бактерій, залучених до експерименту, показали інгібування зростання поблизу колонії *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737. Необхідно відзначити, що до цих видів входили декілька патогенів, таких як *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*. В той же час, 25 % видів бактерій, ріст яких не був інгібований *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737, мали у своєму складі види нормальної мікрофлори, такі як *Escherichia coli*.

Відповідно, існує антибіоз між *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 та іншими бактеріями, що дозволяє застосовувати *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 зовнішньо для антибактерійних цілей.

### 7. Застосування пробіотичної композиції у взаємодії з антибіотиками

Для демонстрування позитивної взаємодії ендоспор *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 з антибіотиками ми провели експеримент в умовах *in vivo* з мишами (BAIB/c).

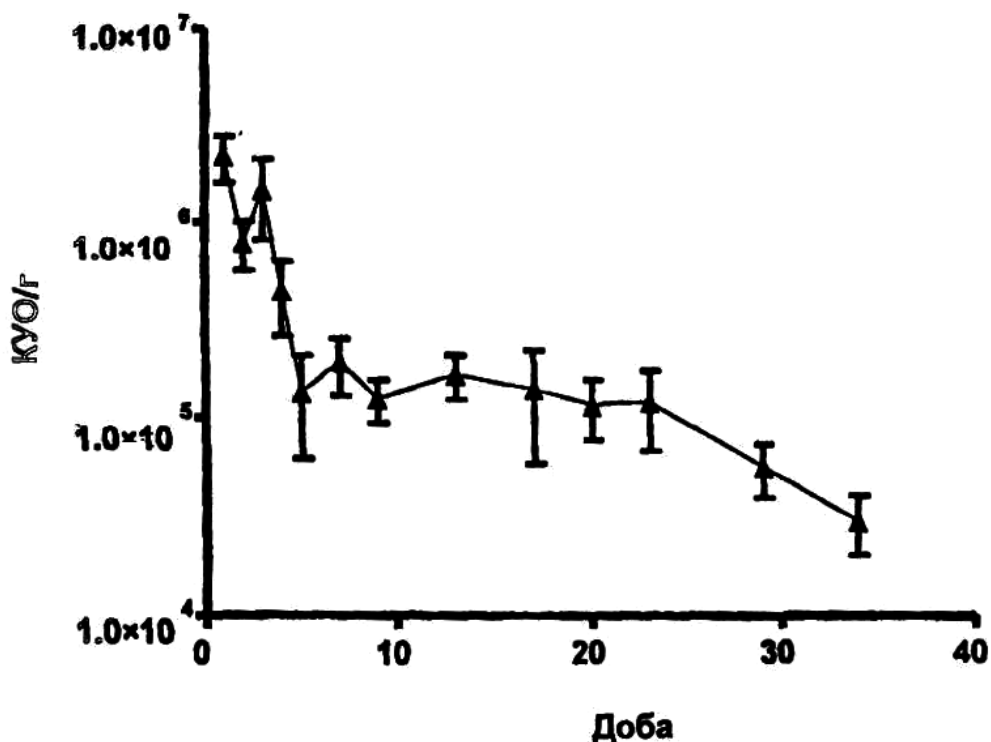
Перед інфікуванням токсичним штамом *Clostridium difficile* VPI 10643 миші потребували 5-денного лікування цефокситином для послаблення мікрофлори досліджуваних тварин. Після інокуляції штамом *Clostridium difficile* VPI 10643 мишей поділили на дві групи. Першій групі мишей вводили метронідазол для лікування *Clostridium difficile* (через 24 години після інокуляції; 15 мг/кг), а іншій групі мишей вводили ендоспори *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 ( $10^8$  ендоспор з кожною дозою антибіотиків 15 мг/кг) на додаток до метронідазолу.

Експеримент виявив, що у випадку мишей, які одержували комбіноване лікування (метронідазол + *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737), кількість *Clostridium difficile* у фекаліях була зменшена більше, ніж у 10 разів (Фіг. 3). Отже, введення ендоспор *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 має потенціал для застосування в антибіотикотерапії.

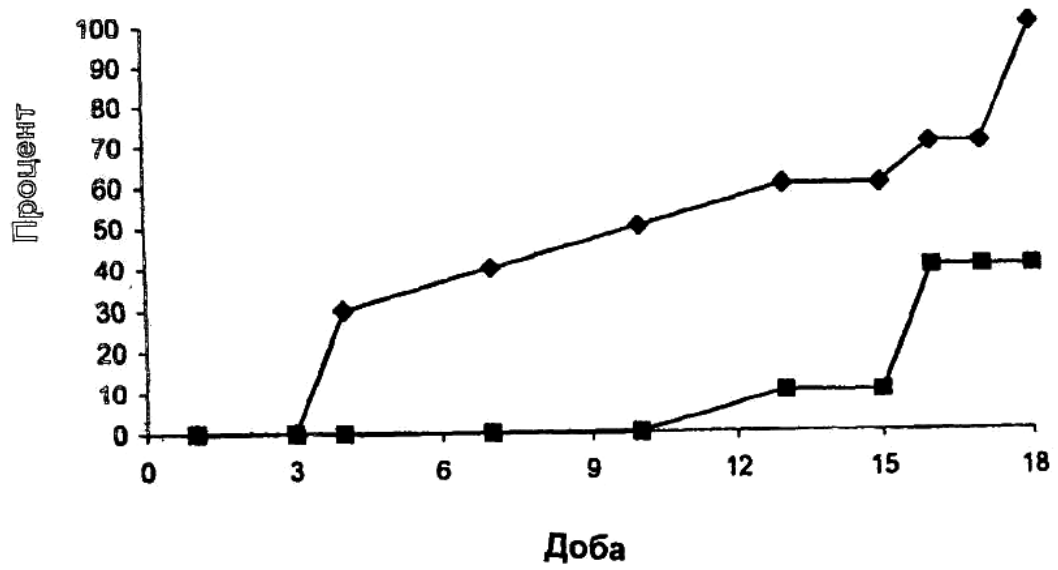
Застосування цього винаходу не обмежується описаними тут прикладами; також можливі інші втілення.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

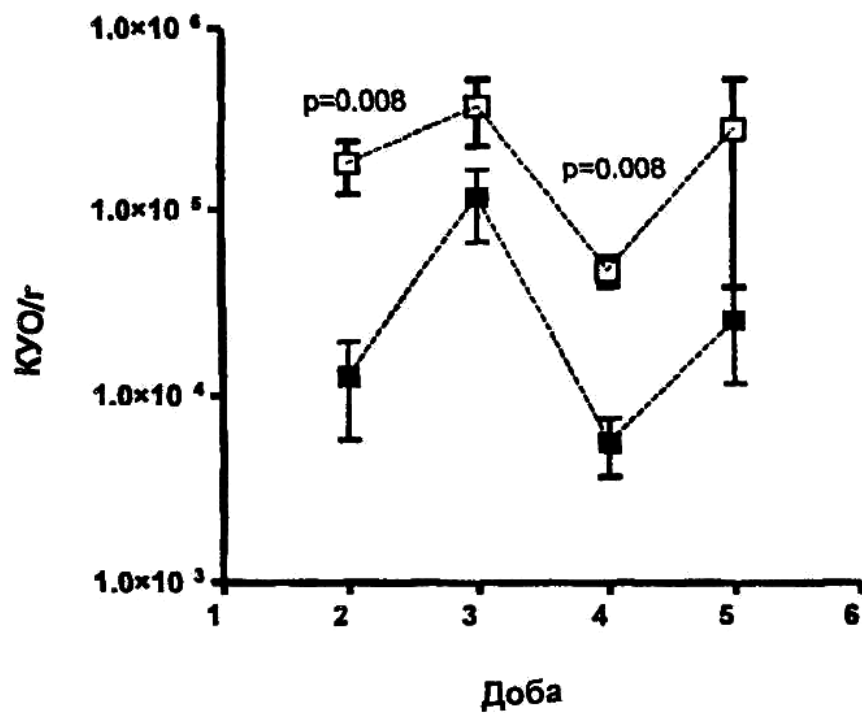
1. Штам мікроорганізму *Bacillus smithii* TBM112 MSCL P737 та його функціональні еквіваленти (ендоспори, мутанти, покоління, похідні) для захисту від дії ентеропатогенних бактерій.
2. Застосування мікроорганізму за п. 1 як харчової та/або кормової добавки.
3. Застосування мікроорганізму за п. 1 як компонента у пробіотичних композиціях.
4. Композиція, яка містить мікроорганізм за п. 1.
5. Композиція за п. 4, яка додатково містить один або більше антибіотиків.
6. Композиція за п. 5, в якій вказаним антибіотиком є метронідазол.
7. Композиція за п. 4 для застосування як пробіотика з метою заселення шлунково-кишкового тракту.
8. Композиція за п. 4 для застосування як пробіотика з метою запобігання бактерійним інфекціям шлунково-кишкового тракту.
9. Композиція за п. 4 для застосування як пробіотика для стимулювання імунної системи.
10. Композиція за п. 4 для зовнішнього застосування як медикаменту для антибактерійних цілей.
11. Композиція за п. 4 для застосування як медикаменту для зменшення або усунення недоліків та побічних ефектів, спричинених лікуванням антибіотиками.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601