

10. Voloshchuk, S. I., Voloshchuk, G. D. (2010). Effect of zearalenone treatment of CF and the efficiency of obtaining haploides in anther culture of soft wheat and triticale. Modern biotechnology and biosafety of crop plants (Plant Genome VI) : VI International Conference, Odessa, 80.

11. Bullock, W. P., Baenziger, P. S., Shaeffer, G. W., Bottino, P. J. (1982). Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F<sub>1</sub>'s and Their reciprocal crosses.

Theoretical and Applied Genetics, 62 (2), 155-159. doi: 10.1007/bf00293350

12. Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, Gh., Sabzalian, M. R. (2007). Genetic analysis of androgenetic traits in wheat (*Triticum aestivum* L.). Iran. J. of biotechnology, 5(1), 34-41.

Рекомендовано до публікації д-р біол. наук Ігнатова С. О.  
Дата надходження рукопису 17.11.2014

**Замбріборщ Ірина Сергіївна**, старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук, Лабораторія культури тканин, Селекційно-генетичний інститут Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3. м. Одеса, Україна, 65036

E-mail: [izambriborsh@gmail.com](mailto:izambriborsh@gmail.com)

**Шестопал Оксана Леонідівна**, старший науковий співробітник, кандидат біологічних наук, Лабораторія культури тканин, Селекційно-генетичний інститут Національного центру насіннезнавства та сортовивчення, Овідіопольська дор., 3. м. Одеса, Україна, 65036

E-mail: [oksana\\_shestopal@mail.ru](mailto:oksana_shestopal@mail.ru)

УДК 579.62

DOI: 10.15587/2313-8416.2014.32023

## ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ШТАМІВ *Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

©В. О. Мілян, М. А. Хархота, О. О. Нечипуренко

Проведено дослідження пробіотичних властивостей, виділених з навколишнього середовища штамів *Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Встановлено їх морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки, досліджено та встановлено високу та середню антагоністичну активність щодо музейних та актуальних штамів умовно патогенних мікроорганізмів. Показана стійкість до низьких та високих значень рН та різних концентрацій жовчаних кислот

**Ключові слова:** бациллярні пробіотики, антагоністична активність бацил, кормові пробіотики, вплив жовчі на бацили, антибіотики

*It is conducted the research of probiotic properties discharged from the environment Bacillus sp. 1.1. and B. amyloliquefaciens UKM B-5113 strains. It is determined their morphological and physiological and biochemical characteristics, investigated and found high and average antagonistic activity against actual museum and opportunistic strains of microorganisms. It is shown a resistance to low and high pH values and different concentrations of bile acids*

**Keywords:** bacillus probiotics, bacillus antagonistic activity, feed probiotics, bacillus react to bile, antibiotics

### 1. Вступ

На сьогоднішній день значного поширення набули шлунково-кишкові розлади дисбактеріозного типу, вони викликають проблеми не лише у людей, а й у сільськогосподарських тварин. За наявності шлунково-кишкових інфекцій в сільськогосподарських тварин погіршується їх самопочуття та зменшується продуктивність, можлива навіть їх загибель, що призводить до негативних наслідків для усього господарства. Часто для лікування шлунково-кишкових захворювань застосовують антибіотичні та пробіотичні препарати.

Принцип дії антибіотичних речовин полягає у їх бактеріостатичній чи бактерицидній дії на чутливі мікроорганізми [1, 2]. Незалежно від спектру дії антибіотика його використання може призводити до загибелі не лише шкідливої, а значної кількості корисної мікрофлори. Зникнення корисної мікро-

флори призводить до ряду негативних наслідків: збільшення ризику повторного інфікування патогенною мікрофлорою, яка надходить разом із їжею; сповільнення природних процесів біодеградації компонентів спожитої їжі, зниження їх енергетичної цінності за рахунок неповного розкладання та всмоктування організмом. Зменшення кількості споживаних речовин призводить до зменшення кількості енергії, яку отримує організм, що призводить до зниження його фізичної та розумової активності.

Аспектом, який відіграє велику роль у використанні антибіотичних речовин є виникнення резистентності у патогенних мікроорганізмів до цих антибіотиків [2], що змушує людей синтезувати нові антибіотики, або циклічно змінювати їх для запобігання неефективного використання антибіотиків до яких розвинулася резистентність.

Використання антибіотичних препаратів у

сільському господарстві призводить до частого виникнення у сільськогосподарської худоби чи птиці різних дисбіотичних станів та шлунково-кишкових інфекцій, які за відсутності адекватного лікування призводять до загибелі худоби чи птиці, а за відсутності лікування – до випуску біологічно небезпечної продукції.

Альтернативною використанням антибіотиків є пробіотики. Пробиотики – лікарські препарати, які містять у своєму складі вегетативні клітини або спори пробіотично-активного мікроорганізму, застосування яких призводить до покращення стану мікрофлори шлунково-кишкового тракту, за умов її дестабілізації [3].

Принцип дії пробіотичних препаратів полягає у відновленні мікрофлори кишківника, яка обумовлена антагоністичною дією до певних видів мікроорганізмів, які спричиняють захворювання шлунково-кишкового тракту. Активність щодо патогенних штамів може бути різною та варіюватись від штаму до штаму, у чому й полягає основна відмінність між різними типами пробіотиків [3].

Більшість пробіотичних препаратів має здатність не лише поліпшувати стан мікрофлори, а й сприяти покращенню процесу засвоєння їжі. Такий ефект досягається за використанням штамів пробіотично-активних мікроорганізмів, які мають різну ферментативну активність: протеолітичну, целюлозолітичну, ксиланолітичну, амілолітичну тощо. Такі мікроорганізми здатні виділяти ферменти, які розщеплюють білки, целюлозу, крохмаль, ксилани, тобто біологічні сполуки, які містяться у кормі худоби чи птиці.

Крім здатності поліпшувати процес засвоєння поживних речовин з їжі пробіотичні штами можуть продукувати біологічно-активні речовини, зокрема: вітаміни, амінокислоти, тощо. Використання пробіотичних штамів, які окрім антагоністичних властивостей мають здатність продукувати біологічно-активні речовини, як компонент корму для сільськогосподарської худоби чи птиці призводить до підвищення швидкості нарощування ваги худоби та птиці, скоротити час їх вирощування, зменшити частоту загибелі та збільшити загальний прибуток.

## 2. Постановка проблеми

Широке застосування антибіотиків у тваринництві та птахівництві призводить до виникнення у худоби та птиці різних дисбіотичних станів та шлунково-кишкових інфекцій. Дане явище пов'язано із невідповідною дією антибіотиків, яка призводить до знищення не тільки патогенної мікрофлори, а й нормальної мікрофлори, що у свою чергу призводить до порушення процесів розщеплення кормів та всмоктування з них поживних речовин.

Для ліквідації спалахів шлунково-кишкових інфекцій антибіотики підходять якнайкраще, тому що швидко знищують шкідливу мікрофлору, проте можливе виникнення побічних ефектів, описаних вище, а також можлива відсутність чи низька ефективність антибіотика в разі наявності резистентності до нього. Отже, використання

антибіотиків для профілактики та лікування шлунково-кишкових захворювань у худоби/птиці може негативно вплинути на стан готової продукції та на загальний вихід останньої.

Використання пробіотиків для профілактики шлунково-кишкових хвороб є позитивним, при цьому патогенні мікроорганізми не набуватимуть резистентності до антибіотиків, які можуть бути застосовані у крайньому випадку, тварини які споживають пробіотики будуть швидше та у повному обсязі засвоювати корисні речовини з кормів, що призведе до швидшого набору маси.

## 3. Літературний огляд

Пробиотики – живі мікроорганізми, вживання яких у адекватних кількостях призводить до покращення стану здоров'я пацієнта [4]. Бактерії роду *Bacillus* використовуються у якості пробіотиків щонайменше 55 років. Першим препаратом на основі бактерій роду *Bacillus*, який виявляв пробіотичні властивості був італійський препарат *Enterogermina*<sup>®</sup>, зареєстрований у 1958 році [4]. Проте, підвищений науковий інтерес до пробіотиків на основі бацил з'явився лише в останні 20 років. В основному цікавість дослідників викликають такі види бацил як: *B.subtilis*, *B.clausii*, *B.cereus*, *B.coagulans*, *B.licheniformis* [4].

На сьогоднішній день пробіотики на основі бацил займають стійку ланку на ринку пробіотиків, які застосовуються для лікування як людей так і тварин [5].

Особливістю пробіотиків на основі бацил є те, що вони здатні утворювати спори, які є стійкими до агресивних чинників навколишнього середовища [4, 5]. Вони здатні зберігати свою життєздатність у широких діапазонах значень рН та температури [4, 5]. Безліч бактерій роду *Bacillus* є природними продуцентами різних ферментних препаратів, антибіотиків та інших біологічно-активних речовин [2], які підвищують їх стійкість по відношенню до інших агресивних мікроорганізмів. Враховуючи те, що бацили – ґрунтові мікроорганізми деякі з них отримали здатність до синтезу меланінів та каротиноїдів, які позитивно впливають на макроорганізми [6].

*Вимоги до пробіотичних штамів мікроорганізмів*

Комітет ООН з продовольчих питань і сільського виробництва і Всесвітня організація охорони здоров'я опублікували наступні вимоги до пробіотичних мікроорганізмів [3]:

– штами, що пропонуються для виробництва пробіотиків, мають бути виділені від здорових людей або видів тварин, для яких вони будуть призначені;

– повинні мати чітке фізіолого-біохімічне та генетичне маркування, як для унеможливлення фальсифікацій, так і для періодичного контролю ідентичності вихідних пробіотичних штамів та виробничих культур у процесі їх культивування;

– мають позитивно впливати на організм хазяїна, що підтверджується лабораторними і клінічними випробуваннями;

– у разі введення у великих кількостях повинні характеризуватися мінімальною здатністю до транслокації з просвіту травного тракту у внутрішнє середовище макроорганізму;

– за тривалого використання не повинні викликати побічних ефектів;

– не повинні пригнічувати нормальний мікробіоценоз;

– мають бути нешкідливими для людей, урахувавши імунологічну безпеку;

– повинні мати колонізаційний потенціал, тобто бути стійкими до природних інгібіторів травного тракту ( низьких значень рН, жовчних кислот, ферментів травлення, антимікробних субстанцій, синтезованих індигенною мікрофлорою), добре адгезуватися до епітелію відповідних слизових оболонок;

– повинні мати природну стійкість щодо сучасних антибактеріальних препаратів;

– повинні мати стабільні характеристики, як з клінічного погляду, так і з технологічного;

– повинні мати високу швидкість росту та розмноження в умовах, наближених до умов шлунково-кишкового тракту;

– мають потрапляти в організм людини в активній формі, минаючи тривалі етапи реактивації клітин, що дасть їм змогу одразу проявляти свою біологічну активність, успішно конкуруючи з потенційними патогенами.

Оскільки більшість бактерій роду *Bacillus* не є патогенними, стабільні при зберіганні, не пригнічують життєдіяльність представників нормального мікробіоценозу кишківника, можна свідчити про можливість використання бацил у вигляді пробіотичних штамів.

*Ринкова ситуація*

На сьогоднішній день на ринку України представлена велика кількість пробіотичних препаратів на основі бацил [7]. До основних відносяться наступні: “Біоспорин”, “Бактерин-СЛ”, “Ендоспорин”, “БіоПлюс”, “Моноспорин”. Усі вони містять у собі суміш бактерій *B.subtilis* *B.lichemiformis* [7].

Препарати виявляють анатагоністичну активність відносно бактерій родів *Campylobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, грибів роду *Candida*. Стимулюють підвищення імунітету макроорганізму шляхом активації макрофагів, посиленню продукції лізоциму та інтерферону. Бацили які входять до складу пробіотиків не впливають на нормальну мікрофлору кишківника [7].

Таким чином на ринку України представлено широкий спектр пробіотичних препаратів бацилярного походження. Проте це не є перешкодою для досліджень у цій сфері. Наявні на ринку пробіотики з плином часу можуть втрачати свою ефективність до актуальних патогенних штамів, у зв'язку із мутаціями останніх або мутаціями самих культур бацил.

**4. Дослідження пробіотичних властивостей штамів *Bacillus. sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113**

У зв'язку із наявністю вимог до пробіотично-активних мікроорганізмів нами було проведено

біохімічну ідентифікацію досліджуваних штамів *Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113.

*Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – грам позитивні аеробні палички, здатні утворювати ендоспори (табл. 1). У мазках 18–24 годинної культури відмічаються поодинокі або розташовані короткими ланцюжками клітини з центральним розташуванням ендоспор, що не роздувають клітини. Біохімічна характеристика штамів *Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 наведена у табл. 1.

Таблиця 1  
Біохімічні властивості штамів *Bacillus sp. 1.1.* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

Ознака	Результат, + - наявність, – відсутність	
	<i>Bacillus sp. 1.1</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113
Довжина клітин > 3 мкм	–	–
Позитивне фарбування за Грамом	+	+
Спори овальні	+	+
Спори розташовані центрально	+	+
Роздування клітини	–	–
Гідроліз ескуліну	+	+
Гідроліз казеїну	+	+
Гідроліз крохмалю	+	+
Наявність уреаз	–	–
Стійкість до хлорамфеніколу	–	–
Стійкість до налдіксивої кислоти	–	–
Стійкість до поліміксину	+	+
Стійкість до стрептоміцину	–	–
Утворення кислоти з:		
Целобіози	+	–
Фруктози	+	+
Галактози	–	–
Лактози	–	–
Маннози	+	+
Рафінози	–	–
Саліцину	+	–
Ксилози	+	+
Утилізація цитрату	–	–
Утилізація сукцинату	+	+
Ріст при 50 °С	–	–
Ріст в присутності 10 % NaCl	–	–
Анаеробний ріст	–	–
Редукція нітратів	–	–
Наявність оксидази	+	+
Тест Вогер-Проскауера	+	+

Для встановлення штамової приналежності досліджуваних мікроорганізмів згідно біохімічних властивостей нами було використано програмне забезпечення *Identax 1.2*. Ідентифікувати штамп з точністю до 95,00 % нам не вдалося. Найбільш близьким таксоном до досліджуваного штаму *Bacillus* sp. 1.1 з 66,17 % подібності є *B. subtilis* ssp. *subtilis*. Встановлена 21,75 % подібність з *B. Amyloliquefaciens*, 7,74 % – *B. pumilis* та 3,60 % *B. cereus*. Незважаючи на близькість штаму *Bacillus* sp. 1.1 до *B. subtilis* ssp. *subtilis*, відмічено, що він володіє кількома атиповими біохімічними ознаками: при культивуванні з рафінозою штамп *Bacillus* sp. 1.1 не продукує кислоти, а 99 % штамів *B. subtilis* ssp. *subtilis* продукують; штамп *Bacillus* sp. 1.1 не здатен утилізувати цитрат та не росте при 50 °С, а 87,00 %

штамів даного виду здатні до росту за вказаної температури і утилізації цитрату.

Проте необхідно враховувати, що штами *B. subtilis* володіють широкою та різноманітною біохімічною активністю. Варто зазначити, що до останнього часу види *B. subtilis* та *B. Amyloliquefaciens* відносилися до виду *B. subtilis*, а різниця між ними на фізіолого-біохімічному та навіть молекулярно-генетичному рівнях є незначною.

*Антагоністична активність*

Висока антагоністична активність – одна з головних вимог до пробіотичних штамів, тому нами було визначено дану характеристику досліджуваних штамів бацил щодо колекційних штамів умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів (рис. 1).

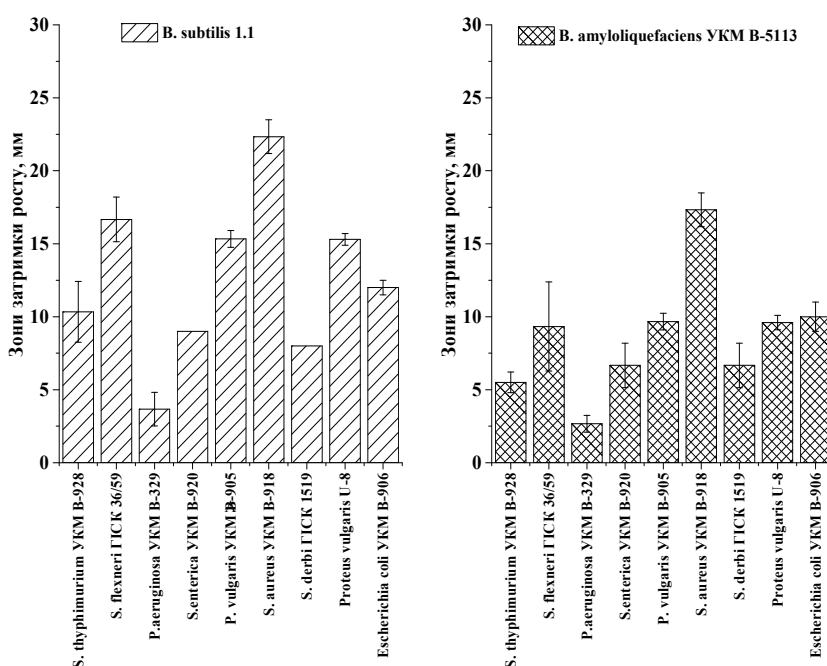


Рис. 1. Антагоністична активність досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* UKM B-5113 щодо музейних штамів тест-культур

Встановлено, що *B. subtilis* 1.1. характеризується високою антагоністичною активністю щодо *Shigella flexneri* ДІСК 36/59, *Proteus vulgaris* UKM B-905, *P. vulgaris* UKM U-8 та *Staphylococcus aureus* UKM B-918 зони затримки росту яких становили 16,7, 20,0, 15,3 та 22,3 мм. Середній рівень антагонізму штамп проявляв щодо *Salonella thyphimurium* UKM B-928, *S. abony* UKM B-921 та *Escherichia coli* UKM B-906, пригнічуючи ріст останніх на 10–12 мм. Визначено, що *B. subtilis* 1.1. володів низьким рівнем антагоністичної активності щодо *S. enterica* UKM B-920, *S. derby* ДІСК 1519 та *Pseudomonas aeruginosa* UKM B-329.

У той час *B. amyloliquefaciens* UKM B-5113 характеризувався високою антагоністичною активністю лише щодо *S. aureus* UKM B-918, зони затримки росту якого становили 17,3 мм. Ріст інших досліджуваних тест-культур був пригнічений менше ніж на 10 мм.

Таким чином нами було досліджено антагоністичну активність досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* UKM B-5113 щодо музейних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ). Проте відомо, що мікроорганізми за тривалого зберігання можуть змінювати свої біологічні властивості, зокрема втрачати фактори патогенності.

Тому нами було досліджено антагоністичну активність штамів *B. subtilis* 1.1. та *B. Amyloliquefaciens* UKM B-5113 щодо широкого спектру актуальних штамів УПМ, які були виділені з домашніх птахів та тварин хворих на шлунково-кишкові інфекції. Роль виділених ізолятів в патогенезі захворювань була підтверджена шляхом біопроби на лабораторних мишах. У зв'язку з тим, що кількість виділених ізолятів певного виду УПМ були значними, а антагоністична активність бацил може бути штамоспецифічною нами для візуалізації

отриманих результатів було використано метод статистичного розподілу антагоністичної активності за величиною зон затримки росту (рис. 2, 3).

Отримані дані свідчать, що антагоністична активність штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо актуальних штамів *E. coli* ( $n_{\text{заг}}=17$ ) (рис. 2) була значно нижча за відповідні показники штаму *B. subtilis* 1.1. Також нами встановлено штамспецифічний характер прояву антагоністичної активності досліджуваних штамів. Так штам *B. Amylo-*

*liquefaciens* УКМ В-5113 проявляв середню антагоністичну активність на рівні 9 мм до 52 % від всіх досліджених ізолятів *E. coli* та високу – 15 мм до 11 % штамів. З частотою 6 % виділялися штами кишкової палички, до яких бацили проявляли низьку антагоністичну активність. Штам *B. subtilis* 1.1 був більш проявляв середню антагоністичну активність щодо *E. coli* – 58 % штамів пригнічувалося на 11–12 мм, 35 % на 14–17 мм.

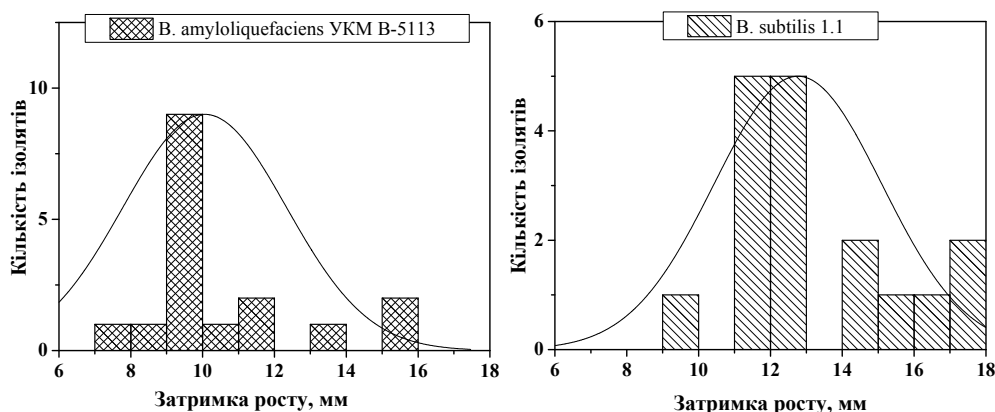


Рис. 2. Розподіл антагоністичної активності штамів *B. subtilis* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо ізолятів *E. coli* за величиною зон затримки росту останніх

Нами відмічено, що антагоністична активність штаму *B. subtilis* 1.1. щодо грамположитивних тест-культур була значно вища, ніж до грамнегативних, а активність штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 не залежала від будови клітинної стінки тест-культур.

Зони затримки росту переважної більшості тест-культур *S. aureus* (рис. 3, а) та *Streptococcus* spp.

(рис. 3, б) штамом *B. subtilis* 1.1. становили 16–20 мм, що свідчить про високу антагоністичну активність. Відмічено також, що з частотою 7 % зустрічалися штами *S. aureus* та *Streptococcus*, антагоністична активність бацил, щодо яких була високою і сягала 24 мм.

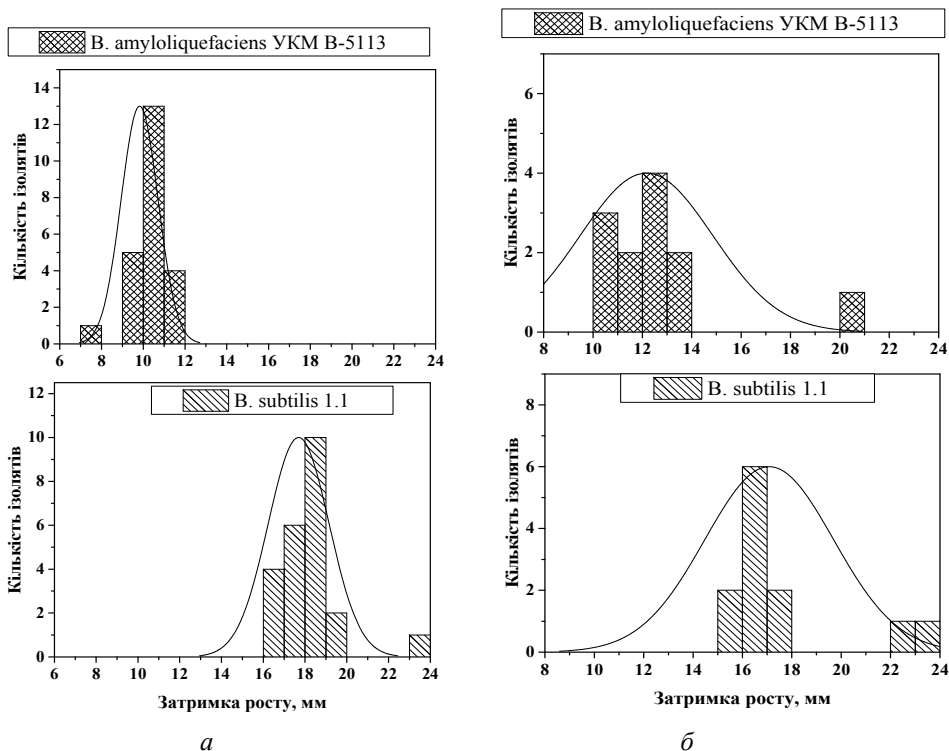


Рис. 3. Розподіл антагоністичної активності штамів *B. subtilis* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо ізолятів за величиною зон затримки їх росту: а – *S. aureus*, б – *Streptococcus* spp

Також було досліджено антагоністичну активність досліджуваних штамів бацил до ряду інших ізолятів представників родів *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (табл. 2).

Встановлено, що досліджувані штами бацил проявляють низьку антагоністичну активність щодо досліджених тест-культур *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*. Антагоністична активність штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо штамів *P. aeruginosa* sp 1, *Enterococcus fecalis* sp 1 та *E. cloaceae* sp 1 була відсутня. Штам *Bacillus* sp. 1.1 щодо даних тест-культур проявляв більшу активність. Необхідно відмітити, що антагоністична активність штаму *Bacillus* sp. 1.1 щодо актуальних штамів *Salmonella* sp лежала в межах 10 мм зон затримки росту, що згідно літературних даних є гранично допустимою мінімальною величиною антагоністичної активності для пробіотичних штамів. Таким чином нами показано, що досліджувані штами *B. subtilis* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 володіли вираженою антагоністичною активністю до штамів *S. aureus* та *Streptococcus*, помірну до *E. coli* та *Proteus* spp та низьку до *P. aeruginosa*, *Enterococcus fecalis* та *E. cloaceae*.

Стійкість досліджуваних штамів щодо жовчі та низьких значень рН

При проходженні через ШКТ пробіотичні мікроорганізми піддаються негативному впливу ряду чинників: соляної кислоти шлунку, травних фермен-

тів, жовчі та жовчних кислот. Тому при відборі штамів мікроорганізмів, перспективних для створення пробіотиків на їх основі необхідно враховувати їх стійкість до несприятливих умов ШКТ. Перш за все при потраплянні до травного тракту мікроорганізми піддаються короткочасному (1–3 год) впливу соляної кислоти. У зв'язку з цим нами встановлено життєздатність досліджуваних штамів при рН 2,0–6,0 та тривалості експозиції 1 год (рис. 4).

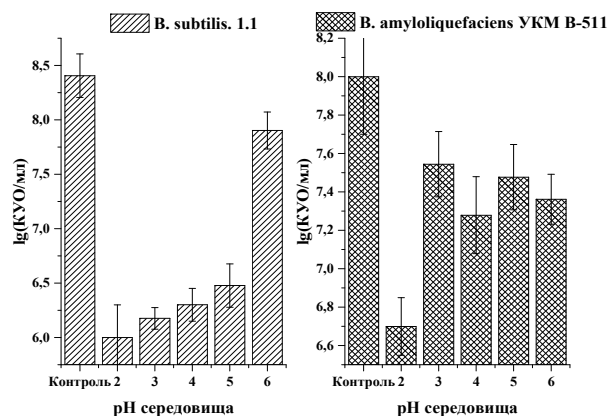


Рис. 4. Життєздатність пробіотичних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при низьких значеннях рН середовища

Антагоністична активність досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1. та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 щодо *Salmonella* sp, *K. pneumoniae*, *E. fecalis* та *P. aeruginosa*

Таблиця 2

Штам мікроорганізму	Зона затримки росту, мм	
	<i>B. subtilis</i> 1.1.	<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113
<i>Salmonella</i> sp 1160	9±1	7±1
<i>Salmonella</i> sp 99	10±2	7±1
<i>Salmonella</i> sp 272	10±1	8±1
<i>Salmonella</i> sp 1	8±2	8±2
<i>Salmonella</i> sp 2	10±1	7±1
<i>K. pneumoniae</i> sp 1	8±1	5±1
<i>E. cloaceae</i> sp 1	7±2	2,7±1
<i>Enterococcus fecalis</i> sp 1	7±2	2,7±2
<i>P. aeruginosa</i> sp 1	4,6±1	1,3±1

Встановлено, що штам *B. subtilis* 1.1 менш стійкий до дії низького рН, ніж *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Так за годинної інкубації при рН 2,0 відмічалось зниження кількості життєздатних клітин на 28,57 та 16,37 % відповідно, порівняно з контролем. При підвищенні рН середовища до 4,0 кількість життєздатних клітин *B. subtilis* 1.1 збільшувалася на 5,0 % порівняно з даними при рН 2, а штаму *B. Amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 8 %. Слід відмітити, що при цьому ми використовували культуру бацил з 10 % рівнем споруляції, тобто в культурі переважали вегетативні клітини. При використанні в складі готового препарату переважно спорової культури, кількість життєздатних клітин була б значно більшою.

Штами мікроорганізмів, що перспективні для створення пробіотичних препаратів повинні бути стійкими до концентрацій жовчі не менше 0,4 %. Нами, встановлено, що досліджувані штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 здатні рости при всіх досліджуваних концентраціях жовчі (рис. 5).

Концентрація жовчі 0,2 % не впливала на ріст кожного з штамів. За умови збільшення концентрації жовчі 0,4 % відмічалось значне зниження кількості життєздатних клітин (на 70 %). В діапазоні концентрацій жовчі 0,6–1,0 % значення оптичної густини (ОГ) вирощеної суспензії *B. subtilis* 1.1 та *B. Amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були у 13 та 6,6 разів менше за відповідні значення в контролі.

Головними складовими жовчі є жовчні кислоти, що переважно представлені кон'югатами з гліцином або таурином. При тяжких розладах травлення або циркуляції жовчних кислот в просвіт кишківника можуть надходити значні кількості некон'югованих жовчних кислот, що характеризуються значною подразливою дією на тканини кишківника та високою бактеріостатичною та бактеріцидною діями на мікрофлору. Тому нами було досліджено ріст досліджуваних штамів *B. Subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 в присутності холієвої (первинної некон'югованої жовчної кислоти) та дезоксихолієвої (вторинної) кислот (рис. 6, 7).

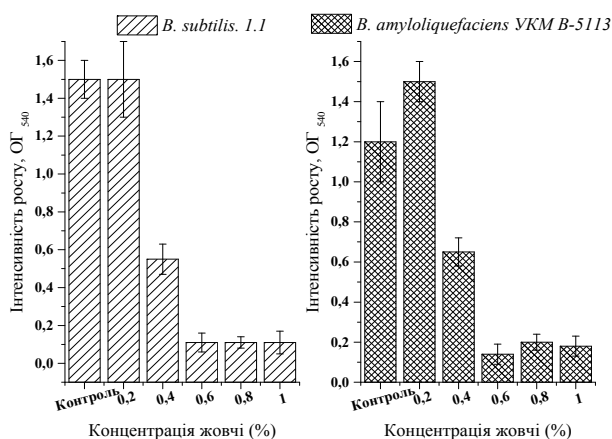


Рис. 5. Ріст досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 в присутності жовчі

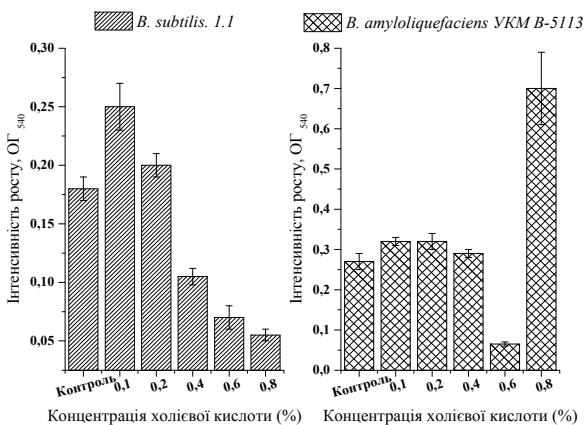


Рис. 6. Ріст досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 в присутності холієвої кислоти

Встановлено, що штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 здатні зберігати високі ростові показники за концентрації холієвої кислоти в середовищі культивування 0,2 та 0,4 %, відповідно. Враховуючи, те що загальний рівень синтезу первинних жовчних в людини становить 400–600 мг/добу, отримані нами результати свідчать, що ріст досліджуваних штамів бактерій в кишківнику не буде інгібуватися цими речовинами. Отримані результати не узгоджуються з повідомленнями про те, що некон'юговані жовчні кислоти чинять більший

бактеріцидний ефект, ніж кон'юговані. Можливо, бацили секретують у поживне середовище значну кількість амінокислот, в тому числі гліцину, який утворює глікохолієву кислоту, зменшуючи, таким чином, негативний вплив на бацили.

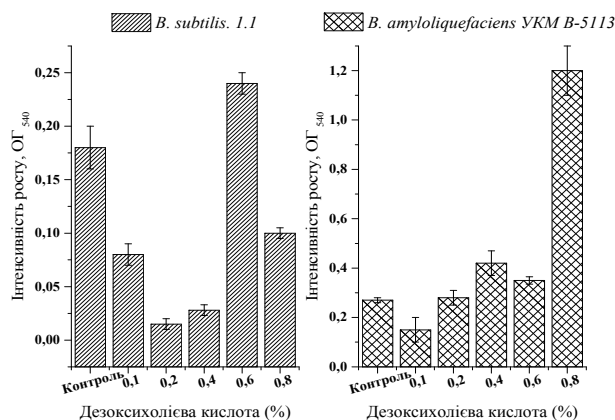


Рис. 7. Ріст досліджуваних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 в присутності дезоксихолієвої кислоти

При дослідженні впливу дезоксихолієвої кислоти на ріст штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були отримані суперечливі результати. При збільшенні концентрації дезоксихолієвої кислоти (ДХК) в середовищі культивування, збільшувався інгібуючий вплив останньої на ріст досліджуваних штамів. Проте при досягненні 0,6 та 0,8 % відсоткового вмісту жовчної кислоти в середовищі відмічалось значне підвищення оптичної густини суспензії бацил. При підрахунку кількості життєздатних клітин штамів бацил в даних варіантах дослідження (дані не представлені), встановлено, що КУО/мл при 0,1 та 0,6 % вмісті ДХК для штаму *B. subtilis* 1.1 та 0,6 та 0,8 % для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 достовірно не відрізнялися. Збільшення ОГ суспензії викликано появою осаду, що імовірно, утворився з ДХК. Дане явище потребує більш докладних досліджень.

Таким чином, нами показано, що штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 здатні витримувати низькі значення рН середовища та високі концентрації жовчі, що задовольняє вимоги до пробіотичних культур.

#### Узагальнення

На сьогоднішній день у зв'язку із виникненням резистентності у патогенних мікроорганізмів до актуальних антибіотиків широкого розповсюдження набувають пробіотичні препарати. У зв'язку із тим, що пробіотики на основі молочнокислих бактерій, як основних мешканців шлунково-кишкового тракту, часто мають низьку антагоністичну активність науковці спрямовують свої дослідження на пошук культур з вищою антагоністичною активністю – наприклад бактерій роду *Bacillus*.

Отже, нами показано, що досліджувані штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 відповідають вимогам, що висуваються до пробіотичних штамів. Досліджувані нами штами –

проявляють середню і високу антагоністичну активність до різних УПМ, здатні до росту за різних значень рН та концентрації жовчі. Особливістю їх є те, що вони здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи, який має провітамінну активність.

### 5. Висновки

Морфологічні та фізіолого-біохімічні дослідження показали, що досліджені мікроорганізми мають 66 % схожість із *B. subtilis ssp. subtilis*.

Досліджувані штами *B. subtilis 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 володіли вираженою антагоністичною активністю до штамів *S. aureus* та *Streptococcus*, помірну до *E. coli* та *Proteus spp* та низьку до *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* та *E. Cloacae*.

Встановлено, що штами *B. subtilis 1.1* та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 здатні витримувати низькі значення рН середовища та високі концентрації жовчі, що задовольняє вимогам до пробіотичних культур.

### Література

1. Пирог, Т. П. Загальна мікробіологія [Текст]: підруч. / Т. П. Пирог; 2-е вид., доп. і перероб. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.
2. Буценко, Л. М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів [Текст] : навч. посіб. / Л. М. Буценко, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К. : НУХТ, 2010. – 323 с.
3. Старовойтова, С. О. Технологія пробіотиків [Текст] : підруч. / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог. – К. : НУХТ, 2012. – 318 с.
4. Cutting, S. Bacillus probiotics [Text] / S. Cutting // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 28, Issue 2. – P. 214–220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007
5. Sanders, M. Sporofomers as human probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus [Text] / M. Sanders, L. Morelli, T. Tompkins // Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2003. – Vol. 2, Issue 3. – P. 101–110. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00017.x
6. Khaneja, R. Carotenoids found in Bacillus [Text] / R. Khaneja, L. Perez-Fons, S. Fakhry, L. Baccigalupi,

S. Steiger, E. To, G. Sandmann, T. Dong, E. Ricca, P. Fraser, S. Cutting // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 108, Issue 6. – P. 1889–1902. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x

7. Похиленко, В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность [Текст] / В. Д. Похиленко, В. В. Перельгин // Газета «Новости медицины и фармации». – 2008. – Т. 18, № 259.

8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 [Text] / N. R. Krieg (Ed). – The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984. – 964 p.

### References

1. Pirog, T. P. (2010). Zagalna microbiologiya [General Microbiology]. NUHT, 632.
2. Bucenko, L. M., Penchuk, Ju. M., Pirog, T. P. (2010). Tekhnologii mikrobnogo sintezy likarskih zasobiv [Technology of drugs microbial synthesis]. Kyiv, Ukraine: NUHT, 323.
3. Starovoytova, S. O., Skrocka, O. I., Penchuk, Ju. M., Pirog, T. P. (2012). Tekhnologiya pobiotikiv [Probiotics technology]. Kyiv, Ukraine: NUHT, 318.
4. Cutting, S. (2011). Bacillus probiotics. Food Microbiology, 28 (2), 214–220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007
5. Sanders, M., Morelli, L., Tompkins, T. (2003). Sporofomers as human probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevibacillus. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2 (3), 101–110. doi 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00017.x
6. Khaneja, R., Perez-Fons, L., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Steiger, S., To, E., Sandmann, G., Dong, T., Ricca, E., Fraser, P., Cutting, S. (2009). Carotenoids found in Bacillus. Journal of Applied Microbiology. 108 (6), 1889–1902. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x
7. Pohilenko, V. D., Pereligin, V. V. (2008). Probiotiki na osnove sporoobrazuyushih bakteriy i ih bezopasnost [Probiotics based on spore-forming bacteria and their safety]. Newspaper “news of Medicine and Pharmacy”, 18 (259).
8. Krieg, N. R. (Ed.) (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 964.

Рекомендовано до публікації д-р мед. наук Авдєєва Л. В.  
Дата надходження рукопису 25.11.2014

**Мілян Владислав Олександрович**, кафедра біотехнології і мікробіології, Національний університет харчових технологій, вул. Володимирська, 68, м. Київ, Україна, 01601  
E-mail: uunium@gmail.com

**Хархота Максим Андрійович**, кандидат біологічних наук, Відділ антибіотиків, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ, Україна, 03143  
E-mail: uunium@gmail.com

**Нечипуренко Олексій Олександрович**, аспірант, Відділ антибіотиків, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, м. Київ, Україна, 03143  
E-mail: uunium@gmail.com