

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

ДИПЛОМНА РОБОТА
бакалавра

на тему: «Вплив умов культивування на продукцію антимікробних речовин бацилами, ізольованими з гідробіонтів Чорного моря»

*Influence of cultivation conditions on the production of antimicrobial substances
by bacilli isolated from the Black Sea aquatic organisms*

Виконала: студентка IV курсу
денної форми навчання
Спеціальність 162 Біотехнології та
біоінженерія
Юлія ПОШЕЛЮЗНА

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Марія РУСАКОВА

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри ботаніки
Олена ПАУЗЕР

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «___» _____ р.

Захищено на засіданні ЕК № _____
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Завідувач кафедри

(підпис) **Тетяна ФІЛІПОВА**
(прізвище та ім'я)

Голова ЕК

(підпис)

Ганна ЯМБОРКО
(прізвище та ім'я)

АНОТАЦІЯ

Визначено спектр антибіотичної активності та складено біотехнологічну схему отримання екзометаболітів, що продукуються штамами *Bacillus atrophaeus* МН4, *Bacillus cereus* subgroup А МН9, *Bacillus subtilis* МБ1, *B. subtilis* ОНУ 481 й *Bacillus megaterium* ОНУ 484.

Температурний режим культивування досить суттєво впливає на ріст досліджуваних представників роду *Bacillus* у рідкому поживному середовищі. Вплив 60 °С-ної 40-хвилинної експозиції призвів до того, що відбулась синхронізація росту досліджуваних штамів, та початок стаціонарної фази для всіх штамів відповідав другій добі. Екзометаболіти, які вироблялись досліджуваними штамми бацил, характеризувались більш вираженою протимікробною активністю щодо бактеріальних культур, в основному щодо грампозитивного виду *Staphylococcus aureus* ОНУ 536. При дослідженні пригнічуючої активності вторинних метаболітів, які синтезувались бацилами за умов аерації, не було зафіксовано розбіжностей між показниками діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізмів.

Роботу викладено на 40 сторінках, вона містить 4 таблиці, 1 рисунок та 1 схему. Наведено посилання на 45 джерел літератури (10 кирилицею та 35 латиницею).

Ключові слова: *Bacillus* sp., антибіотики, екзометаболіти, біотехнологія

The spectrum of antibiotic activity was determined and a biotechnological scheme for obtaining exometabolites produced by strains of *Bacillus atrophaeus* МН4, *Bacillus cereus* subgroup А МН9, *Bacillus subtilis* МБ1, *B. subtilis* ОНУ 481 and *Bacillus megaterium* ОНУ 484 was developed.

The temperature regime of cultivation had a significant impact on the growth of the studied representatives of the genus *Bacillus* in a liquid nutrient medium. The effect of 60 oC 40-minute exposure led to the synchronization of

growth of the studied strains, and the beginning of the stationary phase for all strains corresponded to the second day. Exometabolites, as produced by the studied bacilli strains, were characterized by more pronounced antimicrobial activity against bacterial cultures, mainly against the gram-positive species *Staphylococcus aureus* ONU 536. In the study of inhibitory activity of secondary metabolites synthesized by bacilli. growth of test microorganisms

Thesis is presented on 40 pages, it contains 4 tables, 1 figure and 1 diagram. References are made to 45 sources of literature (10 in Cyrillic and 35 in Latin).

Key words: *Bacillus sp.*, *Antibiotics*, *exometabolites*, *biotechnology*

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Форми взаємодії мікроорганізмів.....	7
1.2. Загальна характеристика та механізм дії сполук з протимікробними властивостями бактеріями роду <i>Bacillus</i>	10
1.3. Шляхи підвищення антибіотикоутворюючої здатності мікроорганізмів.....	13
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	17
2.1. Досліджувані мікроорганізми та умови їх культивування.....	17
2.2. Визначення антибіотичної активності екзометаболітів досліджуваних штамів бацил.....	19
2.3. Схема експерименту для біотехнологічного отримання екзо-метаболітів з використанням досліджуваних штамів бацил.....	20
2.4. Використане під час проведення експериментів обладнання.....	20
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	22
3.1. Вплив температурних умов культивування на досліджувані штами бацил та їх здатність до продукції екзометаболітів.....	22
3.2. Вплив аерації під час культивування досліджуваних штамів бацил на їх здатність виробляти протимікробні	

екзомета-боліти.....	
.....	
ВИСНОВКИ.....	32
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	33
ДОДАТКИ.....	38

ВСТУП

Антагонізм, або активна конкуренція – тип конкурентних взаємовідносин між мікроорганізмами, в ході яких одна популяція продукує речовини, токсичні для іншої. Як правило, продукція даних речовин спостерігається в стаціонарній фазі росту, коли щільність популяцій висока, а ресурси вичерпуються [Фирсов, 2006].

Серед бактеріальних організмів саме група аеробних спороутворюючих бактерій відома своїми сильно вираженими антагоністичними властивостями щодо великої кількості мікроорганізмів. Спороносні бактерії можна поставити в один ряд із актиноміцетами, пеніциллами та аспергіллами, які є основними джерелами антибіотичних речовин [Sorokulova, 2008].

Бактерії роду *Bacillus* – один із найпоширеніших мікроорганізмів у природі. У ґрунті існує багато видів бацил, ці бактерії також часто виділяються з води та повітря. Оскільки вони є скрізь у навколишньому середовищі, ці мікроорганізми легко проникають через харчові продукти, будучи складовою загальної мікробіоти м'яса, молока, хліба тощо [Sorokulova, 2008].

В даний час штами бацил використовуються для виробництва чотирьох груп біологічно активних речовин: 1) ферментів, 2) антибіотиків, 3) високоочищених біологічних продуктів, включаючи підсилювачі запаху та харчові добавки, та 4) інсектициди.

У механізмі антагоністичної активності бактерій роду *Bacillus* одну з ключових ролей виконують антибіотики, синтез яких широко поширений серед представників цього роду. Більшість антибіотиків, утворених бацилами, є нерибосомальними, вони синтезуються бактеріальною культурою в стаціонарній фазі росту. Формування у них пептидного зв'язку відбувається без участі рибосом, але із залученням в процес багатофункціональних специфічних пептидних синтетаз [Joshi et al., 2012; Червинец та ін., 2009].

За кількістю антибіотичних речовин мікроорганізми роду *Bacillus* поступаються лише актиноміцетами. У літературі описано близько 70 різних антибіотиків, що утворюються цими бактеріями: поліміксини, колістин,

бацитрацин, тиротрициновий комплекс, граміцидин С, субтилін, едеїн, бутирозин та ін. [Hancock et al., 1999].

Отже, біотехнологічне виробництво противомікробних речовин, що продукуються бактеріями роду *Bacillus*, є одним з найперспективніших напрямів в сучасній біотехнології, мікробіології та інших галузях.

Мета дослідження полягала у визначенні спектру антибіотичної активності та складання біотехнологічної схеми отримання екзометаболітів, що продукуються штамами *Bacillus atrophaeus* МН4, *Bacillus cereus* subgroup А МН9, *Bacillus subtilis* МБ1, *B. subtilis* ОНУ 481 й *Bacillus megaterium* ОНУ 484.

Для виконання зазначеної мети даного дослідження були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити термін розвитку та термін початку стаціонарної фази для досліджуваних штамів бацил.
2. Охарактеризувати вплив температурного режиму, зокрема 60 °С-ної 40-хвилинної експозиції, та аерації на розвиток досліджуваних штамів бацил у рідкому поживному середовищі .
3. Визначити спектр протимікробної активності екзометаболітів, що синтезуються досліджуваними штамами бацил.
4. Встановити вплив змін умов культивування, а саме температури та аерації, на накопичення протимікробних екзометаболітів досліджуваними штамами мікроорганізмів.

Об'єкт дослідження - синтез вторинних метаболітів представниками роду *Bacillus*.

Предмет дослідження - рівень антибіотичної активності екзометаболітів, концентрація клітин.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Форми взаємодії мікроорганізмів

Мікробне співтовариство являє собою сукупність взаємодій між собою функціонально різних мікроорганізмів. Основу зв'язків в співтоваристві, які об'єднують його в єдине ціле, представляють трофічні зв'язки, обумовлені утворенням і використанням речовин мікроорганізмами. Однак співтовариства мікроорганізмів характеризуються не тільки певною трофічною структурою, але й фізичною організацією [Нетрусов, 2019] (рис. 1, Додаток А).

При взаємодії двох популяцій можна виділити пасивну і активну конкуренцію. Для вивчення конкурентних взаємин здійснюють спільне культивування двох популяцій за певних умов. Безумовно, такий підхід не дозволяє побачити повної картини взаємин мікроорганізмів в природному середовищі, але багато в чому дає змогу прояснити механізми конкурентних взаємин. При пасивної конкуренції кожен з учасників поглинає ресурси, необхідних одночасно обом, не виділяючи в середовище токсичних для свого суперника сполук [Червинец та ін., 2009].

Антагонізм (активна конкуренція) – тип конкурентних взаємовідносин між мікроорганізмами, в ході яких одна популяція продукує речовини, токсичні для іншої популяції. Як правило, продукція даних речовин спостерігається в стаціонарній фазі росту, коли щільність популяцій висока, а ресурси вичерпуються [Фирсов, 2006].

Реалізація конкурентних взаємин може здійснюватися:

- 1) при безпосередньому контакті клітин конкурентів (за допомогою системи секреції VI типу),
- 2) за допомогою продукції в навколишнє середовище токсичних для конкурента метаболітів [Червинец та ін., 2009].

Антагоністична активність може визначатися таким речовинами як: вторинні метаболіти, які змінюють рН середовища; екзоферменти;

антибіо-тики; сідерофори; аналоги сигнальних молекул; бактеріоцини або археоцини.

Пригнічення росту конкурента цими сполуками може відбуватися:

- 1) в результаті прямого згубного впливу на конкурентів (що спостерігається, наприклад, у разі антибіотиків або бактеріоцинів);
- 2) в результаті зміни умов навколишнього середовища (наприклад, при продукції кислот) [Червинец та ін., 2009].

Велике значення в конкурентних взаємовідносинах зокрема, і у взаєминах типу антибіозу в цілому, відіграє рухливість. Рухливі бактерії можуть заселяти нові території, тим самим скорочуючи конкуренцію за обмежені ресурси. Рухливі бактерії можуть уникнути дії спеціальних метаболітів своїх конкурентів. При цьому подвижність важлива для скорочення як внутрішньо-, так і міжвидової конкуренції [Чернявская, 2020].

Пригнічення конкурента за допомогою продукції спеціальних метаболітів:

- 1) Пригнічення конкурентів може відбуватися в результаті накопичення вторинних метаболітів, а саме кислот або лугів, що призводить до значної зміни рН середовища. У молоці починають розвиватися багато популяцій мікроорганізмів, але якщо там присутні молочнокислі бактерії (представники роду *Lactobacillus*), вони в процесі молочнокислого бродіння підкислюють середовище, тим самим витісняючи некислотостійкі популяції. Оцтовокислі бактерії з роду *Acetobacter* в процесі життєдіяльності сильно підкислюють середовище, продукуючи високі концентрації оцтової кислоти. Уробактерій *Sporosarcina pasteurii*, *S. ureae*, що ростуть за присутності сечовини, здійснюють її гідроліз, в результаті чого утворюється аміак, а середовище підлугується [Чернявская, 2020].

- 2) Продукція антибіотиків – специфічних продуктів обміну мікро-організмів, які пригнічують ріст конкурентів. Антибіотики мають різний спектр дії: від вузько специфічних до тих, що мають широкий спектр

дії. При цьому спектр дії корелює з тим, наскільки складне місцеперебування характерно для продуцента і з якою кількістю видів мікроорганізмів він взаємодіє. Наприклад, бактерії роду *Streptomyces* – одні з найбільш активних продуцентів антибіотиків, населяють ґрунт. Ґрунт же характеризується найбільшою різноманітністю мікроорганізмів серед всіх середовищ на Землі. Насправді, значення антибіотиків у природному середовищі може відрізнятися від того, що ми спостерігаємо в лабораторних умовах. Для того, щоб антибіотик надавав інгібуючий вплив, в середовищі повинна бути досягнута мінімальна інгібуюча росту конкурентів концентрація. Однак вкрай малоймовірно досягнення такої концентрації у природному середовищі. Відомо, що присутність антибіотиків у низьких, сублетальних для конкурента концентраціях може призвести до розвитку у нього стійкості [Чернявская, 2020].

Специфічний антагонізм, викликаний утворенням антибактеріальних речовин, особ-ливо антибіотиків. Взаємозв'язок, що виникає в результаті виробництва будь-якої про-тимікробної речовини, можна назвати активним або прямим антагонізмом. Натомість виникає пасивний або непрямий антагонізм, при якому одні мікроорганізми пригнічуються вна-слідок зміни умов середовища, а інші розвиваються у несприятливому напрямку [Нетрусов, 2019].

Антагонізм може бути одностороннім (мікроорганізм пригнічує розвиток свого конкурента) і двостороннім (відбувається взаємне пригнічення мікроорганізмів у співтоваристві) [Фирсов, 2006].

Існує також поняття спрямованого чи примусового антагонізму. У цих відносинах утворення антибактеріальних речовин спостерігалось лише при спільному культивуванні двох різних мікроорганізмів, які не утворюють цих речовин в умовах ізольованого культивування. Антагонізм між мікроорганізмами також можна спостерігати в лабораторії. Активність продуцента антибіотика зазвичай виражається масою антибіотика, що

міститься в одиниці об'єму живильного середовища, в якій вирощувався продуцент [Климнюк та ін., 2004].

Отже, явище антагонізму у мікроорганізмів дуже поширене. Різні типи мікробів впродовж тривалої еволюції у боротьбі за існування розробили певні засоби пригнічення своїх конкурентів. Деякі види витісняють інших своїм численним і дуже швидким розмноженням. Інші види виробляють неспецифічні та специфічні речовини, які стримують ріст великої кількості мікробів. Пізніше виявилось, що мікроби, для яких характерно виділення специфічних продуктів метаболізму, надзвичайно сильно пригнічують розвиток і навіть вбивають мікроби інших видів [Климнюк та ін., 2004].

1.2. Загальна характеристика та механізм дії сполук з протимікробними властивостями бактеріями роду *Bacillus*

Протимікробні засоби – речовини, що пригнічують ріст і розмноження або викликають загибель різних груп мікроорганізмів – бактерій, хламідій, грибів, найпростіших, спірохет, вірусів. Антимікробні препарати класифікуються за напрямком дії (наприклад, протигрибкові, протипротозойні, протитуберкульозні, противірусні препарати), за сферою застосування (антисептики, дезінфікуючі засоби), за способами отримання препаратів (синтетичні, мікробні, напівсинтетичні) [Baruzzi et al., 2011].

Протимікробні засоби використовують для профілактики та лікування інфекційних захворювань людей і тварин, для збереження продуктів харчування, тканин, шкіри, деревини, дезінфекції обладнання, матеріалів, приміщень [Jenssen et al., 2006].

Кількість відомих антибіотиків, що продукуються бацилами, в даний час наближається до 200. За кількістю антибіотичних речовин мікроорганізми роду *Bacillus* поступаються лише актиноміцетами. У літературі описано близько 70 різних антибіотиків, що утворюються цими бактеріями: поліміксини, колістин, бацитрацин, тиротрициновий комплекс (лінійний

граміцидин + тироцидин), граміцидин С, субтилін, едеїн, бутирозин та ін. [Hancock et al., 1999].

Рід *Bacillus* здатний продукувати велику кількість антимікробних речовин, що визначає їх перспективність у пошуку нових інгібуючих речовин [Bizani et al., 2005]. Дослідження показали, що представники роду *Bacillus* виробляють широкий спектр протимікробних речовин саме пептидної природи, включаючи ті, що синтезуються з залученням рибосом та «нерибосомно», зокрема ліпопептиди, бактеріоцини, глікопептиди, циклічні пептиди та інші види пептидів [Baindara et al., 2013]. Багато досліджень щодо виділення різних штамів бацил, які мешкають у ґрунті, супроводжувалось також ідентифікацією їх протимікробних сполук [Moshafi et al., 2011].

Нерибосомні пептиди збираються модульними ферментними комплексами, так званими нерибосомними пептидними синтетазами, до цього процесу не залучаються рибосоми [Hahn et al., 2004].

Такі пептидні антибіотики бацил, як граміцидин, тирокідин, бацитрацин, сурфактин, ітурини та фенгіцини, синтезуються нерибосомно за допомогою багатоступеневого механізму, що включає виділення та конденсацію залишків амінокислот за допомогою мультиферментних тіотемплатів. Нерибосомно синтезовані пептиди збираються з-понад 300 різних попередників. [Hancock et al., 1999; Chapple, 1999].

Пептидні антибіотики, синтезовані на рибосомах, широко поширені в природі і містять від 12 до 50 амінокислотних залишків. Вони, як правило, катіонні та мають велику структурну різноманітність [Marks, 2001].

Утворення пептидних антибіотиків представниками роду *Bacillus* контролюється вмістом Нітрогену та Карбону у поживному середовищі, їх співвідношення може змінити взаємозв'язок між характером росту культури та кількістю утворених антибіотиків. Пригнічення синтезу антибіотиків визначається не зміною рН середовища, а утворенням органічних кислот (оцтової та піровиноградної) з глюкози [<https://bit.ly/2Pyeivt>].

Отже, антимікробні речовини, які синтезуються представниками роду *Bacillus*, можуть бути перспективною альтернативою класичних антибіотиків для ефективного лікування інфекційних процесів, збудники яких виявляються стійкими до одного або декількох препаратів [Arguelles-Arias et al., 2009].

Хоча було запропоновано декілька теорій для пояснення молекулярних процесів, індукованих AMP, до тепер є незрозумілим, який із передбачуваних механізмів, якщо такий є, відповідає за їх біологічну активність. Сьогодні запропоновано декілька моделей, точний механізм яких, можливо, залежатиме від природи пептиду та щільності бактерій, що його продукують [Pálffy et al., 2009].

Різні види бацил виробляють бактеріоцини або бактеріоциноподібні речовини з різними механізмами дії. Як правило, бактеріоцини є катіонними пептидами, які виявляють гідрофобні або амфіфільні властивості, і в більшості випадків бактеріальна мембрана є мішенню їх впливу. Кілька моделей припускають, що механізм дії катіонних пептидів передбачає утворення каналів, через які можуть проходити іони, та/або порушення бактеріальної цитоплазматичної мембрани [Huang et al., 2009; Pálffy, 2009]. Антибіотична активність цереїну 8A, швидше за все, зумовлена протоплазматичною везикуляризацією, утворенням пор і повною деградацією мембрани клітин [Bizani et al., 2005].

Одним з найбільш активно синтезуючих протимікробні речовини видом бацил є *B. subtilis*. Унікальність цієї бактерії полягає в тому, що 4-5% її генома містить інформацію про синтез різноманітних протимікробних речовин [Arguelles-Arias et al., 2009]. До 2005 року у різних штамів *B. subtilis* було виділено близько 24 відповідних речовин, але на 2015 рік – вже 66, і перелік продовжує зростати. Велика частина протимікробних речовин представлена рибосомально і нерибосомально синтезованими пептидами. В меншій кількості виявляють непептидні речовини, наприклад полікетіди, аміноцукри і фосфоліпіди [Awais et al., 2010]. Різні штами *B. subtilis* виділяють різний набір протимікробних речовин. Однак в будь-якому випадку спектр

антагоністичної активності вияляється досить широким. Наприклад, штам *B. subtilis* ATCC 6633 виділяє субтілін, що є антибіотиком проти грампозитивних бактерій. Інший штам *B. subtilis* A1/3 не виділяє субтілін, проте він утворює антибіотик еріцин S, що характеризується тим же самим механізмом дії та спектром активності, що й субтілін [Baruzzi et al., 2011].

Протимікробні пептиди, що виділяються *B. subtilis*, володіють величезною перевагою у порівнянні з традиційними антибіотиками. Справа в тому, що вони близькі до протимікробних пептидів, які виділяються в організмі людини і є частиною його вродженого імунітету [Amin et al., 2012]. Відповідні речовини були ідентифіковані для великої кількості тканин, включаючи тих, що утворюють шкіру, очі, вуха, порожнину рота, кишечник, імунну, нервову і сечовидільну системи. Найбільш відомі з них дефензіни, лізоцим, кателіцидин, дермцидин, лектин, гістатин і ін. *B. subtilis* виділяють подібні речовини, тому резистентність до них виникає рідко, побічні ефекти зазвичай відсутні. Відсутність резистентності до протимікробних пептидів людини і *B. subtilis* пов'язують з тим, що їх дія частіше направлено на формування мембранних пор, що призводять до загибелі бактерій. Активність традиційних антибіотиків більше сфокусована на метаболічних ферментах бактерій, що полегшує формування резистентності [Wang, 2014].

1.3. Шляхи підвищення антибіотикоутворюючої здатності мікроорганізмів

Сучасне промислове виробництво антибіотиків є складною багатоступінчастою біотехнологічною системою, що складається з кількох послідовних етапів [Сарматова, 2012].

1. Етап біосинтезу (формування) антибіотиків, основним завданням якого є створення оптимальних умов для розвитку продуцентів і максимально можливого біосинтезу антибіотиків. Висока ефективність цього етапу залежить від рівня біосинтетичної активності продуцента, часу максимального накопичення та вартості середовища для культури організму.

Для отримання максимального виходу антибіотиків при вирощуванні продукту застосовують комплекс заходів, що включають підбір найбільш сприятливих для цих цілей поживних середовищ і режимів культивування. Усе це є частиною концепції керованого синтезу [Сарматова, 2012].

2. Етапи попередньої обробки культурального бульйону, мікробних клітин (міцелію) та фільтрації (відділення культурального бульйону від біомаси продуцента), ефективність яких залежить від складу середовища зростання продуцента антибіотика, його природи, його зростання, місцем на-накопичення антибіотика в культуральній рідині [Сарматова, 2012].

3. Стадія виділення та очищення антибіотиків, яка характеризується реалізацією підвищення концентрації антибіотиків (від 1% до 20-30%). Основними застосовуваними методами є екстракція, осадження, адсорбція на іонообмінному матеріалі, випарювання, сушка [Сарматова, 2012].

4. Стадія отримання готового продукту, виготовлення та пакування лікарської форми, головною вимогою є висока якість кінцевого продукту. Готові антибіотики ретельно контролюються: біологічний та фармакологічний контроль. У першому випадку ставиться завдання визначення стерильності готового продукту, що забезпечується дотриманням асептичних умов роботи на всіх етапах процесу розвитку продуцента, виділення та очищення препарату. Фармакологічний контроль передбачає вивчення токсичності, пірогенності, алергії та інших властивостей препарату [Сарматова, 2012].

Мікроорганізми, що продукують антибіотики, виділені з природних матриць, як правило, мають низьку антибіотичну активність. Тому різні штами *Penicillium*, виділені з ґрунту, утворюють пеніцилін при вирощуванні на глибині від 10 до 30 од/мл бульйону. *Streptomyces griseus*, виробник стрептоміцину, вперше виділив 3 штами. Ваксман і його колеги утворили до 100 мкг/мл стрептоміцину з сильно удобрених ґрунтів. Зрозуміло, що потреби медицини, сільського господарства та окремих галузей не можуть бути

задоволені без отримання найпродуктивніших штамів організмів, що утворюють антибіотичні речовини [Барышева, 2016].

Тому виникає нагальна потреба в розробці методів підвищення біосинтезу антибіотиків, що мають практичне значення. При його розв'язанні в основному використовується кілька тісно пов'язаних методів, зокрема індукований мутагенез і поетапний відбір найбільш активних форм виробництва антибіотиків, а також генно-інженерні маніпуляції [Сарматова, 2012].

Застосування методів спрямованої селекції та генної інженерії у роботі з мікроорганізмами, що продукують антибіотики, створюють нову епоху промислової мікробіології.

З розвитком та появою технологій секвенування геномів стало очевидним, що більшість бактеріальних геномів містять приховане багатство скупчень, відповідальних за біосинтез потенційних біоактивних сполук, які чекають на відкриття [Pareek, 2011]. Основною причиною існування такої безлічі нерозкритих біосинтетичних шляхів є те, що багато кластерів генів перебувають у стані спокою або не експресуються в достатній кількості, щоб їх можна було виявити за типових умов ферментації. Безперечно, низька продукція цих сполук є серйозною перешкодою на шляху до їх комерційного виробництва. Отже, вивчення та розуміння взаємодії між синтезом антибіотиків, регуляторними мережами та внутрішньоклітинними сигналами, надасть ключі до розуміння надпродукції спеціалізованих метаболітів [Ochi et al., 2013].

Нині розробляються та вдосконалюються низка стратегій поліпшення штамів. Класичний підхід до поліпшення штаму заснований на мутагенезі та подальшому відборі отриманих мутантів. Незважаючи на свої недоліки (небажані мутації), ця стратегія була успішною і широко використовувалася для швидкого зростання мікроорганізмів, що продукують антибіотики. Більшість промислових надлишків продуктів, які використовуються сьогодні, розроблені таким чином. Проте з розвитком молекулярної біології,

біотехнології, біоінформатики, технологій секвенування та синтетичної біології з'явилися нові стратегії, які дозволяють покращувати штами [Medema et al., 2011].

Незважаючи на відкриття різних класів антимікробних препаратів у скринінгу мікробних природних продуктів, існує нагальна потреба в нових молекулах з новими механізмами дії проти нових і мультирезистентних грампозитивних і грамнегативних патогенів. Класичний скринінг нових антибактеріальних препаратів на основі біологічної активності також покладається на попередні знання екологічної та геномної інформації мікробних ізолятів для оцінки їх потенціалу продукувати різні сполуки в різних умовах культивування. Ферментаційне середовище та інші параметри будуть відрізнятися залежно від знання різних елікторів і спеціальних джерел вуглецю, азоту та фосфору. Швидкий прогрес у дослідженні та розумінні взаємодії між виробництвом антибіотиків, регуляторними мережами та передачею сигналів у навколишньому середовищі та всередині клітин тепер є ключем до відкриття та надлишкового виробництва нових антибіотиків [Mannanov et al., 2001].

В даний час широкий спектр підходів до генної інженерії надають великий спектр інструментів для раціонального поліпшення штамів і ферментації, які можуть прискорити відкриття та розробку нових ефективних ліків. Поєднання зростаючого обсягу знань у сучасних технологіях (наприклад, секвенування всього геному, транскрипція та профілювання метаболітів) дає можливість на основі біоінформатики прогнозувати можливі методи виявлення та покращення конкретних метаболітів [Arguelles-Arias et al., 2009]. Безсумнівно, подальший розвиток функціональної геноміки та інших методів контраналізу, що приведе до відкриття багатьох нових сигнальних шляхів та нових факторів транскрипції, відкриє нові та привабливі цілі для підходів до поліпшення штамів у найближчому майбутньому. Крім того, підходи, що використовуються в метаболічній інженерії, продовжують створювати чудову основу не тільки для створення

надвиробників, але й для подальшого дослідження та експлуатації прихованої частини мікробного багатства [Medema et al., 2011].

Головною метою сьогодні є розробка набору технологій, які можуть бути використані для стимулювання вироблення криптичних метаболічних генів та ідентифікації раніше не повідомлених молекул, з достатнім урожаєм для подолання однієї з головних проблем цього століття: відсутність нових антибіотиків [Singh et al., 2011; Medema et al., 2011].

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Досліджувані мікроорганізми та умови їх культивування

Дослідження щодо визначення впливу умов культивування на продукцію антибіотичних сполук представниками роду *Bacillus* було здійснено на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології, а також в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

В експерименті були використані штами мікроорганізмів, отримані з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова: *Bacillus atrophaeus* МН4, *B. subtilis* МБ1 та *Bacillus cereus* subgroup А МН9, що виділено з гідробіонтів Чорного моря, та *Bacillus subtilis* ОНУ 481 й *Bacillus megaterium* ОНУ 484.

Для відновлення штамів з колекції після довготривалого зберігання, їх підтримки впродовж поверхневого культивування було вжито поживне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА). Його склад становив, г/л: 15 г агар-агару, 33 г м'ясо-пептонного бульйону [Awais et al., 2010].

Також в роботі було використано рідке поживне середовище м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) для основного культивування досліджуваних мікроорганізмів [Mannanov et al., 2001]:

Поживні середовища було простерилізовано під тиском при 120 °С впродовж 30 хвилин.

Весь скляний посуд та інструменти (пінцети, бактеріологічні петлі, свердла для лунок), що було використано в дослідженні, попередньо простерилізовано у сухожаровій шафі впродовж години при температурі 180 °С для попередження контамінації.

Використані в дослідженнях мікроорганізми попередньо культивувались на щільному середовищі МПА в термостаті при 22 °С впродовж 24 годин. Після цього етапу культивування готували клітинні суспензії досліджуваних штамів на основі попередньо простерилізованого фізіологічного розчину та визначали їх оптичну густину з використанням

стандарту за МакФарландом, яка відповідала $1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл [Cockerill et al., 2012].

Із кожного варіанту суспензії відбирали по 2,0 мл і вносили у 100 мл рідкого поживного середовища МПБ. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 500 мл; для аерації культур колби поміщали на гойдалку зі швидкістю обертання 150 об/хв та інкубували при температурі 22 °С. Тривалість інкубації становила 5 діб.

Для визначення впливу факторів навколишнього середовища на ріст та синтез сполук з протимікробною активністю досліджуваними штамми бацил основний етап експерименту було проведено у наступних варіантах:

варіант I – аерація, 22 °С;

варіант II – аерація, 60 °С (впродовж 40 хвилин);

варіант III – за відсутності аерації, 22 °С;

варіант IV – за відсутності аерації, 60 °С (впродовж 40 хвилин).

Встановлення кількості клітин мікроорганізмів здійснювалось спектрофотометричним методом, відбираючи зразки по 1,5 мл та вимірюючи їх оптичну щільність [Chen et al., 2014]. Для цього проби досліджуваних мікроорганізмів центрифугували 20 хвилин при 10000 g та температурі 14 °С, після чого відібрали надосадову рідину, а осаджену масу клітин ресуспендували в стерильному фізіологічному розчині [Ahire et al., 2020].

Оптичну щільність отриманих проб було встановлено з використанням спектрофотометру «μQuant» (BioTek Instruments, США) при довжині хвилі 540 нм. Для кожної культури розраховували середнє арифметичне відповідно до кожного періоду культивування.

Показники, що отримали після вимірювання, перерахували у кількість КУО/мл поживного середовища як показник накопичення мікробної біомаси за допомогою калібрувальної кривої, що відповідає цим мікроорганізмам.

Загалом, під час культивування були визначені наступні параметри: кількість клітин у суспензіях та строки розвитку та тривалість окремих стадій росту культур.

2.2. Визначення антибіотичної активності екзометаболітів досліджуваних штамів бацил

За тест-мікроорганізми для визначення антибіотичної активності екзометаболітів досліджуваних бацил було використано штами тест-мікроорганізмів *Escherichia coli* ONU 458 (грамнегативний мікроорганізм), *Staphylococcus aureus* ONU 536 (грампозитивний мікроорганізм), *Candida albicans* ATCC 18804 (представник грибів), що було взято з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова.

Для відновлення та підтримання росту тест-мікроорганізмів було використано поживне середовище МПА. Культивування проводилося в термостаті та тривало 24 години при температурі 37 °C [Berghaus et al., 2015].

Перевірку антибіотичної активності екзаметаболітів, що синтезуються досліджуваними штамами, було проведено за допомогою методу лунок в агарі, що складався з наступних етапів:

- 1) в чашки Петрі діаметром 9 см розливали по 25 мл стерильного поживного середовища МПА;
- 2) у асептичних умовах за допомогою бактеріальної петлі на поверхні застиглому середовища розподіляли біомасу тест-мікроорганізмів;
- 3) в поживному середовищі стерильним пробійним свердлом робили лунки (для кожної доби відбору зразків та контролю, до якої вносили стерильне поживне середовище) діаметром 6 мм;
- 4) в лунки вносили зразки надосадової рідини, отримані при культивуванні досліджуваних штамів, об'ємом 0,2 мл;
- 5) культивування тест-мікроорганізмів здійснювали в термостаті при 37 °C впродовж 2 діб;
- 6) впродовж окремих періодів культивування визначали зону відсутності росту тест-мікроорганізмів навколо лунок, вимірюючи її діаметр у мм: відсутність росту тест-штамів розраховували як середнє арифметичне

трьох вимірів проекцій, що були обрані випадково. Отримані результати величин округлили до цілого [Balouiri et al., 2015].

Для кожного варіанту досліджуваних штамів було зроблено 5 повторів.

2.3. Схема експерименту для біотехнологічного отримання екзометаболітів з використанням досліджуваних штамів бацил

Для отримання екзометаболітів із антимікробними властивостями, що синтезуються досліджуваними штамми бактерій роду *Bacillus*, було складено схему, представлену на рисунку 2 (Додаток Б).

Кожний етап дослідження відповідав стадії експерименту, який було проведено з метою отримання екзометаболітів, що синтезуються досліджуваними штамми бацил.

2.4. Використане під час проведення експериментів обладнання

В процесі роботи було використано наступне лабораторне обладнання:

1. для зберігання культур продуцентів, тест-штамів та супернатанту - холодильник «STINOL» STS167AA(UA) (Indesit International, РФ);
2. для приготування поживного середовища - ваги лабораторні механічні ВЛР-200г 2 клас N90 (ЛенВес, РФ), плитка електрична «Wimrex» WX-100A-HP (Wimrex, КНДР);
3. для стерилізації поживного середовища - автоклав (стерилізатор паровий) ТК-100-3М (Тюмень-Медик, РФ);
4. для стерилізації лабораторного посуду та інструментів - сухожарова шафа ГП-10 (Тюмень, РФ);
5. для мікробіологічних маніпуляції (пересіви, проведення тесту методом лунок) - витяжна хімічна шафа, оснащена бактерицидною лампою (лінійною ртутною лампою низького тиску Philips TUV 30W/G30 T8 G13, Philips, Нідерланди);
6. для відновлення культури з колекції та поверхневого культивування мікроорганізмів – термостат ТС-80М-2 (Himlabpribor,

Узбекистан), холодильник «STINOL» STS167AA(UA) (Indesit International, РФ);

7. для культивування мікроорганізмів – гойдалка «INNOVA 43» (New Brunswick Scientific, США);

8. для процесів обробки проб суспензій для отримання надосадової рідини та клітинного осаду, що досліджуються – центрифуга рефрижераторна «Centrifuge 5417 R» (Eppendorf, Німеччина), центрифуга для мікропробірок «Eppendorf MiniSpin» (Eppendorf, Німеччина), апарат для струшування тип АВ-10П (ВетКом, РФ) спектрофотометр «μQuant» (BioTek Instruments, США).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив температурних умов культивування на досліджувані штами бацил та їх здатність до продукції екзометаболітів

Температура є важливим фактором навколишнього середовища, який впливає на фізіологічні функції всіх організмів. Особливо це стосується мікроорганізмів, оскільки вони є пойкилотермами, тобто їх температура відповідає температурі навколишнього середовища [Convey et al., 2014; Davey et al., 1992, Peck et al., 2006].

Для досягнення високого рівня синтезу екзометаболітів проводили періодичне культивування штамів роду *Bacillus* за різної температури. Отримані результати представлено у таблиці 1. Як видно з представлених результатів, температурний режим культивування досить суттєво впливав на ріст досліджуваних представників роду *Bacillus*. Але при цьому, в обох випадках було визначено нетривалий строк адаптації до використаного поживного середовища. Отже, термін лаг-фази становив 24 год. За цей період тривалість періоду адаптації може бути різною, але зазвичай вона прямо пропорційна тривалості попередньої стаціонарної фази. У свіжому середовищі тривалість лаг-фази залежить від кількості та віку посівного матеріалу, а також від змін складу та концентрації поживних компонентів при внесенні інокулята [Avtsinov et al., 2018].

Наступна доба відповідала фазі експоненційного росту мікроорганізмів: оптична густина досліджуваних суспензій збільшувалась приблизно від 6 до 8 разів для *Bacillus cereus* subgroup A МН9 та *Bacillus atrophaeus* МН4, відповідно, якщо порівнювати з попереднім строком культивування.

Взагалі, ця фаза росту мікроорганізмів зазвичай не підтримується у мікробній популяції тривалий час. У нормі він обмежується внаслідок вичерпання доступних джерел живлення, або накопичення токсичних продуктів обміну речовин у поживному середовищі, або через деякі зміни у фізичних властивостях середовища. Внаслідок цього швидкість цього

процесу знижується і, зрештою, зростання припиняється [Avtsinov et al., 2018].

Таблиця 1

**Накопичення біомаси досліджуваними штамами бацил під час
культивування за різних температурних умов***

Штам бацил	Термін культивування, доба					
	0	1	2	3	4	5
температура 22 °С						
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	0,15±0,1	5,7±0,1	45,6±0,3	49,1±0,2	48,4±0,1	47,6±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1		6,1±0,2	43,9±0,2	45,7±0,1	46,1±0,2	46,0±0,2
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9		6,0±0,1	37,4±0,1	61,0±0,3	60,5±0,3	61,8±0,4
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481		7,4±0,2	49,6±0,2	50,4±0,2	48,8±0,1	47,9±0,1
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484		5,9±0,1	40,7±0,2	52,8±0,3	63,0±0,3	64,1±0,3
температура 60 °С (впродовж 40 хвилин)						
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	0,15±0,1	3,2±0,1	17,3±0,2	30,6±0,2	31,8±0,2	30,9±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1		3,4±0,2	15,6±0,2	34,1±0,2	36,7±0,2	38,0±0,2
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9		2,9±0,1	11,8±0,1	28,5±0,1	30,5±0,1	31,4±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481		3,8±0,2	18,2±0,2	39,3±0,2	40,1±0,3	41,2±0,3
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484		2,7±0,1	10,4±0,1	32,4±0,1	33,8±0,2	31,0±0,1

Примітка: * - результати представлено у вигляді $\cdot 10^9$ КУО/мл поживного середовища; – початок стаціонарної фази росту досліджуваних мікроорганізмів.

Третя доба культивування характеризувалась більш повільною швидкістю зростання досліджуваних мікроорганізмів. Проте, тільки для *Bacillus cereus* subgroup A МН9 продовження терміну культивування супроводжувалось суттєвим збільшенням мікроорганізмів у порівнянні з попередньою добою. В цілому, відповідні значення кількості клітин у суспензіях коливались від 45,7 до $61,0 \cdot 10^9$ КУО/мл поживного середовища. Найбільша величина спостерігалась у випадку *Bacillus cereus* subgroup A МН9 найменша – для *Bacillus subtilis* МБ1. Такі зміни свідчать, очевидно, про перехід досліджуваних культур до стаціонарної фази в якій збільшення кількості клітин не відбувається, але клітини ще потребують джерел енергії для підтримки своєї життєдіяльності. Перехід з експоненційної фази в стаціонарну включає період незбалансованого зростання, коли різні клітинні компоненти синтезуються з різними швидкостями. Тому в стаціонарній фазі хімічний склад клітин відрізняється від їхнього складу в експоненційній фазі. Клітини менші за розміром і менш чутливі до фізичних та хімічних впливів. У стаціонарній фазі кількість біомаси залишається постійною. Подальше спостереження за ростом бацил показало, що термін стаціонарної фази росту цих мікроорганізмів відповідав від третьої до п'ятої доби культивування. Таке припущення було зроблено, виходячи з того, що показники кількості клітин у суспензіях практично не змінювались за цей період [Avtsinov et al., 2018; Balouiri et al., 2016].

Вплив температурної експозиції під час культивування бацил у рідкому поживному середовищі призвів до наступних «наслідків»:

- 1) швидкість зростання мікроорганізмів значно зменшилась, починаючи вже з першої доби розвитку;
- 2) спостерігалась синхронізація росту досліджуваних штамів.

Що стосується першої закономірності, то 40-хвилинне підвищення температури до 60 °C викликало суттєве зниження накопичення біомаси бацил. Відповідні показники розрізнялись практично у 1,5-3 рази з тими, що

були зафіксовані для мікроорганізмів при 22 °С. При цьому більш вираженими розбіжності виявились на більш ранніх строках культивування.

Синхронізація росту мікроорганізмів є одним з прийомів багатьох біотехнологічних процесів, який здійснюється з метою отримання суспензій клітин, що перебувають в спорідненому фізіологічному стані. Тобто всі клітини таких культур в окремі моменти розвитку знаходяться в однаковій фазі. Існує значна кількість способів для ініціації синхронізації різних мікроорганізмів; зокрема механічні, або селективні; для фізичних факторів, зокрема температури; хіміко-біологічний вплив, наприклад, метаболічний шок.

Друга група методів пов'язана з фізичними впливами, що також ведуть популяцію до синхронного розмноження. У цьому напрямі найбільшого поширення набули температурні впливи. Синхронізація популяцій за допомогою зміни температури культивування досягається одноразовою (шок) або багаторазовою (зрушення температури між двома рівнями) дією більш високої або нижчої температури порівняно з оптимальною для даного виду мікроорганізмів. Така температурна дія, блокуючи процес розподілу, не зупиняє зростання та розвитку клітин, що зрештою призводить популяцію в однорідний стан. Після зняття шоку від 70 до 90% клітин ділиться синхронно [Balouiri et al., 2016].

Отже в роботі одноразове підвищення температури виклало синхронізацію росту досліджуваних штамів бацил. При цьому, для всіх культур це проявилось вже на другу добу спостереження: розбіжності між відповідними показниками виявились значно меншими за ті, що були зафіксовані за попередніх умов культивування.

Також було визначено, що синхронність поділу клітин досліджуваних мікроорганізмів зберігалось й на наступних строках експерименту. Взагалі, третя – п'ята доби росту бацил характеризувались практично постійними значеннями кількості клітин у суспензії. Це означає, очевидно, їх перебування у стаціонарній фазі росту.

Для визначення здатності досліджуваних представників роду *Bacillus* до продукції біологічно активних речовин з протимікробною активністю в роботі був використаний метод лунок в агарі. З досліджень відомо, що більшість сполук з такою активністю продукується впродовж стаціонарної фази росту. Наприклад, поліпептидний антибіотик I типу бацитроцину, який продукується штамом *Bacillus subtilis* 26d під час утворення спор. Тому в роботі було досліджено здатність до продукції протимікробних сполук використаними мікроорганізмами, ріст яких знаходився саме у стаціонарній фазі (табл. 2). Тобто при культивуванні при 22 °C це була друга доба, проте, при 60 °C-ному впливі впродовж 40 хвилин – на третю добу.

Таблиця 2

**Протимікробна активність сполук, що продукуються
досліджуваними штамми бацил**

Штам бацил	Тест-мікроорганізм*		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ONU 536	<i>Escherichia coli</i> ONU 458	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804
температура 22 °C			
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	17±1	12±1	–
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	22±2	17±1	–
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9	15±1	13±1	–
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	24±2	19±1	11
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484	20±2	15±1	–
температура 60 °C (впродовж 40 хвилин)			
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	19±1	13	–
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	27±1	18±1	13±1
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9	19±1	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	27±2	23±2	11±1
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484	24±2	19±1	–

Примітка: * - дані представлено у вигляді діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо лунки з надосадовою рідиною, яка утворювалась при зростанні бацил, мм ; – - затримки росту тест-мікроорганізму не було зафіксовано.

Як видно з представлених результатів, температура, а саме її одноразове підвищення до 60 °C впродовж 40 хвилин під час культивування досліджуваних штамів бацил, викликала зміни не тільки у інтенсивності їх росту, але й активності тих метаболітів, які продукуються ними. Так, для більшості представників роду *Bacillus* спостерігалось збільшення діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізмів або взагалі її поява. Особливо це було помітно щодо впливу отриманих зразків надосадової рідини на культуру *Escherichia coli* ONU 458.

Що стосується активності метаболітів бацил щодо *Staphylococcus aureus* ONU 536, то найбільш чутливим даний мікроорганізм виявився до сполук, які синтезувались штамми *Bacillus subtilis* ОНУ 481 та МБ1. Така ситуація була визначена при обох варіантах температурного режиму. При цьому, у випадку використання за тест-мікроорганізм культури *Candida albicans* ATCC 18804, було встановлено відсутність протимікробної дії метаболітів досліджуваних штамів бацил.

Згідно з численними дослідженнями, штами бацил здатні рости та синтезувати протигрибкові метаболіти в діапазоні температур від 25 до 37 °C, тоді як у культур, інкубованих при 15°C протягом 7 днів, антибіотична активність не була виявлена, це говорить про те, що температура сильно впливає на вироблення антибактеріальних молекул. Накопичення метаболітів антибіотиків зменшувалося з підвищенням температури культури в 3-4 рази [Chen et al., 2015; Bell et al., 2013].

Температура культури однозначно впливає на виробництво вторинних метаболітів і вироблення протимікробних молекул у досліджуваних штаммах бацил, але чіткої та послідовної закономірності не було виявлено [Dehghani et al., 2015].

3.2. Вплив аерації під час культивування досліджуваних штамів бацил на їх здатність виробляти протимікробні екзометаболіти

Добре відомо, що на ріст мікробів та продукцію їх метаболітів, великий вплив мають компоненти середовища та фізичні фактори, такі як перемішування, аерація, температура, час ферментації та розчинений кисень [Potumarthi et al., 2007].

Встановлено, що зі збільшенням аерації вихід мікробних клітин, рівень використання ними субстрату, а також питома швидкість зростання збільшуються. Інтенсивна аерація 44 - 58 г O_2 /л на год сприяє створенню найбільш оптимальних умов зростання бактерій. При погіршенні аерації до 3,2 г O_2 /л і вище знижуються питома швидкість зростання та вихід життєздатних клітин. Оптимальні умови подачі повітря та середня швидкість перемішування скорочують тривалість ферментації, не впливаючи на кінцевий вихід біомаси [Bajaј et al., 2010; Smirnov et al., 1993].

В роботі було визначено вплив аерації на накопичення біомаси досліджуваними штамми. При цьому культивування мікроорганізмів проводилось за таких умов, як постійна аерація та однократне 40-хвилинне прогрівання до 60 °C (табл. 3).

Як видно з представлених результатів, примусове насичення киснем середовища культивування має вплив на процес накопичення біомаси досліджуваними мікроорганізмами. Однак, цей фактор характеризувався досить різними ефектами щодо росту бацил. Так, впродовж експоненційної фази за впливом аерації відбувалось гальмування росту мікроорганізмів. Про це свідчать отримані результати: кількість КУО/мл у цьому випадку була нижчою, ніж у варіанті культивування за відсутності аерації [Avtsinov et al., 2018].

Проте, вже починаючи з третьої доби, тобто початку стаціонарної фази росту, було зафіксоване збільшення біомаси досліджуваних штамів бацил при культивуванні за умов аерації у порівнянні з варіантом за її відсутності.

У такому випадку відповідні показники для штамів *Bacillus subtilis* ОНУ 481 та *Bacillus megaterium* ОНУ 484 були на 9-20% вищими за аналогічні у попередньому варіанті експерименту. Очевидно, це обумовлено тим, що збільшення вмісту кисню у середовище культивування у деяких штамів бацил ініціює та/або прискорює процес утворення ними спор. Отже, з огляду на таку дію, а також враховуючи те, що спори бацил починають утворюватися саме з початком стаціонарної фази, можна зробити припущення, що аерація мала більший вплив саме починаючи з третьої доби.

Таблиця 3

**Накопичення біомаси досліджуваними штамми бацил під час
культивування за різних режимів аерації***

Штам бацил		Термін культивування, доба				
		0	1	2	3	4
за відсутності аерації						
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	0,15±0,1	5,7±0,1	45,6±0,1	49,1±0,1	48,4±0,1	47,6±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1		6,1±0,1	43,9±0,2	45,7±0,1	46,1±0,1	46,0±0,1
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9		6,0±0,1	37,4±0,1	61,0±0,3	60,0 ±0,5	61,8±0,4
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481		7,4±0,1	49,6±0,2	50,4±0,2	48,8±0,1	47,9±0,2
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484		5,9±0,1	40,7±0,3	52,8±0,2	63,0±0,4	64,1±0,4
за умов постійної аерації						
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	0,15±0,1	2,8±0,1	12,8±0,1	32,7±0,3	30,5±0,1	30,0±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1		2,6±0,1	9,3±0,1	36,3±0,1	37,8±0,1	36,2±0,2
<i>Bacillus cereus</i> subgroup A МН9		2,0±0,1	10,1±0,2	30,4±0,1	29,5±0,1	30,6±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481		3,4±0,2	15,9±0,2	43,2±0,2	42,9±0,2	41,2±0,2
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484		2,5±0,1	11,7±0,1	38,7±0,2	40,0±0,1	39,5±0,1

Примітка: * - дані представлено у вигляді $\cdot 10^9$ КУО/мл поживного середовища.

Що стосується таких штамів бацил, як *Bacillus atrophaeus* МН4, *Bacillus subtilis* МБ1, *Bacillus cereus* subgroup А МН9, то кисень меншою мірою впливав на інтенсивність їх стаціонарної фази: показники кількості клітин для них практично не розрізнялись в обох варіантах дослідження. Можливо, у цьому випадку мало значення місця виділення штамів. Вище згадані штами було виділено з гідробіонтів Чорного моря, тобто природним середовищем їх існування є мікроаерофільні умови. А це означає, що метаболізм є менш залежним від вмісту кисню в навколишньому середовищі.

В роботі також була досліджена протимікробна активність сполук, що утворюються відібраними штамами бацил, які культивувались за умов аерації (табл. 4).

Таблиця 4

**Протимікробна активність сполук, що продукуються досліджуваними
штамами бацил**

Штам бацил	Тест – мікроорганізм*		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ONU 536	<i>Escherichia coli</i> ONU 458	<i>Candida albicans</i> ATCC 18804
температура 60°С за відсутності аерації			
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	19±1	13±1	–
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	27±2	18±2	13
<i>Bacillus cereus</i> subgroup А МН9	19±1	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	27±3	23±2	11±1
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484	24±2	19±1	–
температура 60°с за умов аерації			
<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	20±1	15±1	–
<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	25±2	18±1	–

Продовження таблиці 4

<i>Bacillus cereus</i> subgroup A MH9	21±1	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	25±2	20±2	10±1
<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484	27±3	15±1	—

Примітка: * - дані представлено у вигляді діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо лунки з надосадовою рідиною, яка утворювалась при зростанні бацил, мм ; — - затримки росту тест-мікроорганізму не було зафіксовано.

Визначення пригнічуючої активності вторинних метаболітів, які синтезувались досліджуваними бацилами за умов аерації, показало, що цей фактор не мав суттєвого впливу на відповідний процес. Так, у жодному разі не було зафіксовано розбіжностей між показниками діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізмів. Проте, як й у попередньому випадку, більш вираженим пригнічення виявилось у випадку грампозитивного штаму *Staphylococcus aureus* ONU 536. В цілому, ефективність щодо даного виду бактерій була від 25% (для *Bacillus subtilis* ОНУ 481) до 80% (для *Bacillus megaterium* ОНУ 484) вищою, порівнюючи з *Escherichia coli* ONU 458. Також для *Bacillus cereus* subgroup A MH9, затримки росту *Escherichia coli* ONU 458, взагалі не було зафіксовано.

Ще однією спільною рисою активності отриманих метаболітів досліджуваних штамів бацил було те, що вони не виявляли протигрибкової дії щодо культури *Candida albicans* ATCC 18804.

Таким чином, ті сполуки, які синтезувались досліджуваними штамми бацил характеризувались протибактеріальною активністю, але більш вираженою щодо грампозитивних мікроорганізмів що й було доведено.

ВИСНОВКИ

1. Температурний режим культивування досить суттєво впливав на ріст досліджуваних представників роду *Bacillus* (*B. atrophaeus* МН4, *B. subtilis* МБ1, *B. cereus* subgroup А МН9, *B. subtilis* ОНУ 481, *B. megaterium* ОНУ 484) у рідкому поживному середовищі. Вплив 60 °С-ної 40-хвилинної експозиції призвів до того, що відбулась синхронізація росту досліджуваних штамів, та початок стаціонарної фази для всіх штамів відповідав другій добі.

2. Екзометаболіти, які вироблялись досліджуваними штамми бацил, характеризувались більш вираженою протимікробною активністю щодо бактеріальних культур, в основному щодо грампозитивного виду *Staphylococcus aureus* ОНУ 536. У випадку *Escherichia coli* ОНУ 458 та *Candida albicans* ATCC 18804 показники діаметру зони затримки росту мікроорганізмів виявились значно меншими або взагалі їх не було зафіксовано.

3. При культивуванні за умов аерації не було зафіксовано достовірних змін у інтенсивності накопичення біомаси досліджуваних штамів бацил у порівнянні з варіантом за її відсутності.

4. При дослідженні пригнічуючої активності вторинних метаболітів, які синтезувались бацилами за умов аерації, не було зафіксовано розбіжностей між показниками діаметру зони затримки росту тест-мікроорганізмів: більш вираженим пригнічення виявилось щодо грампозитивного мікроорганізму *Staphylococcus aureus* ОНУ 536.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антибактериальные вещества, продуцируемые бактериями рода *Bacillus* // Пробиотик OLiN. – Electr. дан. – Режим доступа: <https://bit.ly/2Pyeivt> (дата звернення: 15.11.2021). – Загол. з екрана.
2. Барышева Е. С. Современные методы борьбы с бактериальными и вирусными инфекциями / Е. С. Барышева, А. Н. Сизенцов // Издательство Юрайт. – Оренбург, 2016. – С.12
3. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров – Москва, 2004. – С. 321-400.
4. Климнюк С. І. Практична мікробіологія: Посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, М. С. Творко, В. П. Широбоков // Укрмедкнига. – Тернопіль, 2004. – С. 45-78.
5. Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов: учебник для бакалавров. – 2-е изд., / А. И Нетрусов – Москва: Издательство Юрайт, 2019. – 267 с.
6. Савустьяненко А. В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* / А. В Савустьяненко // Актуальная инфектология, – Том. 2, № 11. – 2016. – С. 35-44.
7. Сарматова Н. И. Антибиотики: Методические указания к практическим занятиям / сост. Н. И. Сарматова. – Сиб. федер. ун-т, – Красноярск, 2012. – 29 с.
8. Фирсов Н. Н. Микробиология: словарь терминов / Н. Н.Фирсов, М. И. Дрофа. – Москва, 2006. – 256 с.
9. Червинец Ю. В. Антагонистическая активность пробиотических штамов / Ю. В. Червинец, В. М. Червинец, А. М. Самоукина, Е. С. Михайлова // Успехи современного естествознания. – 2009. – Том. 2. – С. 73-73.
10. Чернявская М. Электронный учебно-методический комплекс по курсу «Микробная синэкология» / М. И. Чернявская // Белорусский государственный университет. – Минск, 2020. – С. 19 – 31.

11. Ahire J.J. Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. / J.J. Ahire, M.S. Kashikar, S.G. Lakshmi, R. Madempudi // 3 Biotech – 2020. – Vol. 10. – P. 112.
12. Amin, A. Production of peptide antibiotics by *Bacillus sp.* GU 057 indigenously isolated from saline soil / M.A. Khan, M. Ehsanullah, U. Haroon, S.M. Azam, A. Hameed // Braz. J. Microbiol. – 2012. – Vol. 43 – P. 1340–1346.
13. Arguelles-Arias A., *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens / M. Ongena, B. Halimi, L. Yannick, A. Brans, P. Fickers // MiCell Factories – 2009. – Vol. 63, № 8.
14. Avtsinov I. Modeling of Periodic Process of Cultivation of Microorganisms / I. Avtsinov, N. Sukhanova, Yu. Kozhevnikov // Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tehnikeskogo universiteta. – 2018. – Vol. 24, № 1. – P. 116-123.
15. Awais M. Production of Antimicrobial Metabolites by *Bacillus subtilis* Immobilized in Polyacrylamide Gel / M. Awais, A. Pervez, M. M. Shah // Pakistan: J. Zool., 2010. – Vol. 42, № 3. – P. 267-275.
16. Baidara P. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample / P. Baidara, S. M. Mandal, N. Chawla, P. K. Singh, A. K. Pinnaka, S. Korpole // AMB Express, – 2013. – Vol. 3, № 1.
17. Bajaj I. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly (γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. / I.B. Bajaj, R.S. Singhal // Biotechnol. Bioprocess Eng. – 2010. – Vol. 15. – P. 635–640.
18. Balouiri M. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review / M. Balouiri, M. Sadiki, SK. Ibnsouda // J. Pharm. Anal. – 2016. – Vol. 6, № 2 – P. 71-79.

19. Baruzzi F. Antimicrobial Compounds Produced by *Bacillus* spp. and Applications in Food / F. Baruzzi, L. Quintieri, M. Morea, L. Caputo // Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Formatex – Spain, 2011. Vol. 3. – P. 112-111.
20. Bell T. Microbial competition in polar soils: a review of an understudied but potentially important control on productivity / T. H. Bell, K. L. Callender, L. G. Whyte, C. W. Greer // Biology. – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 533-554.
21. Berghaus L. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equi* / L. J. Berghaus, S. Giguère, K. Guldbach, E. Warner, U. Ugorji, R. D. Berghaus et al // Journal of clinical microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 314-318.
22. Bizani D. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus* / D. Bizani, A. S. Motta, J. A. Morrissy, R. M. Terra, A. A. Souto, A. N. Brandeii // Int. Microbiol. – 2005. – Vol. 8, № 2. – P. 125–131.
23. Chen D. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt / D. Chen, X. Liu, C. Li, W. Tian, Q. Shen, B. Shen // J. Environ. Manag. – 2014. – V. 137, № 18. – P. 120–127.
24. Chen W. C. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. / W. C. Chen, R. S. Juang, Y. H. Wei // Biochem. Engin. – 2015. – Vol. 103. – P. 158-169.
25. Cockerill F. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests / F. R. Cockerill, M. A. Wikler, J. Alder, M. N. Dudley, G. M. Eliopoulos, M. J. Ferraro, B. Zimmer // M100-S22, CLSI. – 2012. – Vol. 32, № 3. – P. 84-86.
26. Convey P. The spatial structure of Antarctic biodiversity / S. L. Chown, A. Clarke, D. K. Barnes, S. Bokhorst, V. Cummings // Ecological monographs. – 2014. – Vol. 84, № 2. – P. 203-244.
27. Davey M. Temperature variation and its biological significance in fellfield habitats on a maritime Antarctic island / M. C. Davey, J. Pickup, W. Block // Antarctic Science. – 1992. – Vol. 4, № 4. – P. 383-388.

28. Dehgahi R. Review of research on fungal pathogen attack and plant defense mechanism against pathogen / R. Dehgahi, S. Subramaniam, L. Zakaria, A. Joniyas, F. B. Firouzjahi, K. Haghnama, M. Razinataj // Int. J. Sci. Res. Agric. Sci. – 2015. – Vol. 2, № 8. – P. 197-208.
29. Hahn M. Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains / M. Hahn, T. Stachelhaus // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101, № 44.
30. Hancock R. E. W. Peptide antibiotics. Antimicrobs / R. E. W. Hancock, D. S. Chapple // Agents Chemother. – 1999. – Vol. 43, № 6. – P. 137–133.
31. Huang T. Isolation of a variant of subtilisin A with hemolytic activity / T. Huang, H. Geng, V. R. Miyyapuram, C. S. Sit, J. C. Vederas, M. M Nakano // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, № 18. – P. 560–569.
32. Jenssen H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R. E. Hancock // Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 491–511.
33. Joshi R. D. Studies on production of peptide antibiotic by thermotolerant *Bacillus sp.* / R. D. Joshi, V. S. Hamde, A. M. Umrikar, S. S. Kulkarni, M. A. Bhate // Int. Multidisciplin. Res. J. – 2012. – Vol. 2, № 6. – P. 30–33.
34. Machado A. *Bacillus subtilis* induces morphological changes in *Fonsecaea pedrosoi* in vitro resulting in more resistant fungal forms in vivo / A. P. Machado, M. Anzai, O. Fischman // Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. – 2010. – Vol. 16. – P. 592-598.
35. Mannanov R. Antibiotics produced by *Bacillus* BACTERIA / R. N. Mannanov, R. K. Sattarova // Chemistry of Natural Compounds. – 2001. – Vol. 37, № 2.
36. Moshafi M.S. Antimicrobial activity of *Bacillus sp.* strain FAS1 isolated from soil / M. S. Moshafi, H. Forootanfar, A. Ameri, M. Shakibaie, G. Dehghan-Nau deh, M. Razavi // Pharm. Sci. – 2011. – Vol. 24, № 3. – P. 269–275.
37. Medema M. The future of industrial antibiotic production: from random mutagenesis to synthetic biology / M. H. Medema, M. T. Alam, R. Breitling, E. Takano // Bioengineered Bugs. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 230–233.

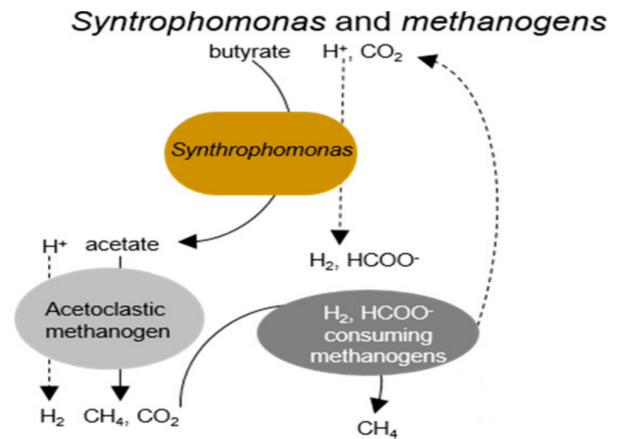
38. Ochi K. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters / Ochi K., Hosaka T // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 97, № 1. – P. 87–98.
39. Pálffy R. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides / R. Pálffy, R. Gardlík, M. Behuliak, L. Kadasi, J. Turna, P. Celec // *Mol. Med.* – 2009. – Vol. 15, №1–2. – P. 51–59.
40. Peck L. Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability / L. S. Peck, P. Convey, D. K. A. Barnes // *Biological reviews*. – 2006. – Vol. 81, №. 1. – P. 75–109.
41. Potumarthi R. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: effect of aeration and agitation regimes / R. Potumarthi, S. Ch, A. Jetty // *Biochemical Engineering Journal*. – 2007. – Vol. 34, №. 2. – P. 185–192.
42. Singh S. B. Screening strategies for discovery of antibacterial natural products / S. B. Singh, K. Young, L. Miesel // *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. – 2011. – Vol. 9, №. 8, – P. 589–613.
43. Smirnov V. The growth and sporulation of *Bacillus subtilis* under different aeration conditions / V.V. Smirnov, A.I. Osadchaia, V.A. Kudriavtsev, L.A. Safronova // *Mikrobiol Zh.* – 1993. – Vol.55, №. 3, – P. 38–44.
44. Sorokulova I. B. Preclinical Testing in the Development of Probiotics: A Regulatory Perspective with *Bacillus* Strains as an Example / I. B. Sorokulova // *Clinical Infectious Diseases* – 2008. – Vol. 46. – P. 92–95.
45. Wang G. Human Antimicrobial Peptides and Proteins / G. Wang // *Pharmaceuticals*. — 2014. — Vol. 7, № 5. — P. 545–594.

ДОДАТКИ

Додаток А

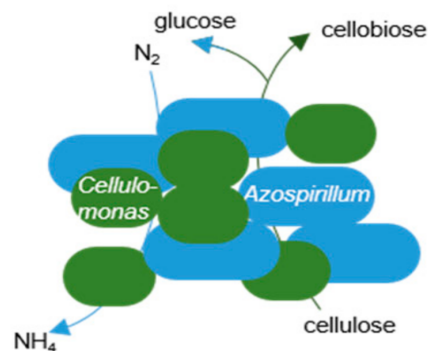
Рис. 1 Форми взаємодії мікроорганізмів *in vivo* [Machado et al., 2010]

Синтрофія – взаємодія, під час якої один з видів отримує переваги у споживанні субстратів через наявність іншого мікроорганізму



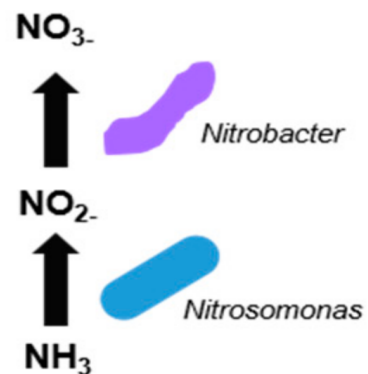
Протокооперація – взаємовигідні відносини двох незалежних видів

N_2 -fixing bacteria and cellulolytic bacteria (e.g. *Cellulomonas*)

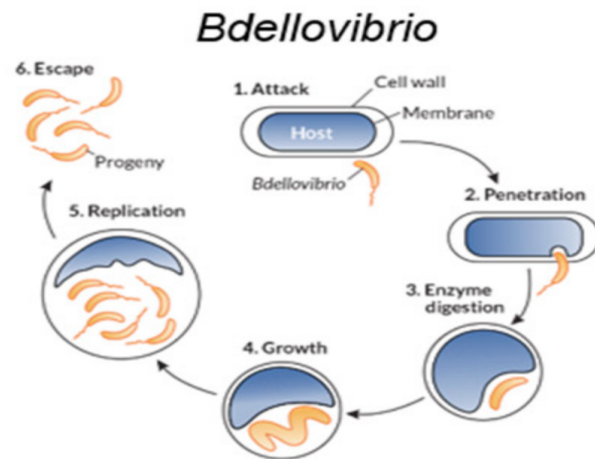


Комменсалізм – один з видів отримує вигоду від взаємодії, інший – не піддається жодному впливу

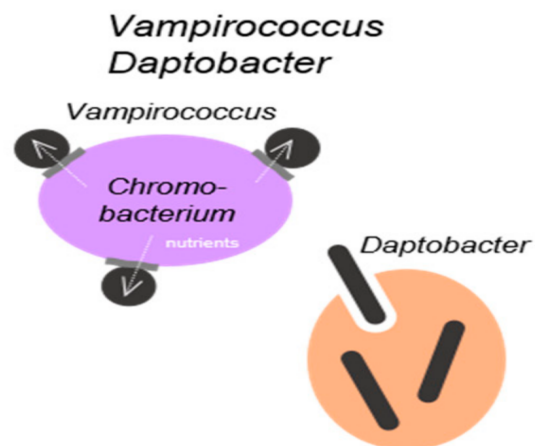
Nitrosomonas and *Nitrobacter*



Паразитизм – один з видів отримує переваги за рахунок іншого



Хижацтво – вбивство одного з видів та використання його клітин за джерело поживних речовин



Антагонізм – пригнічення одного виду іншим

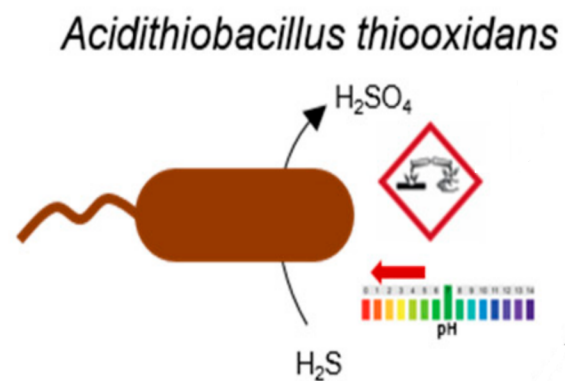
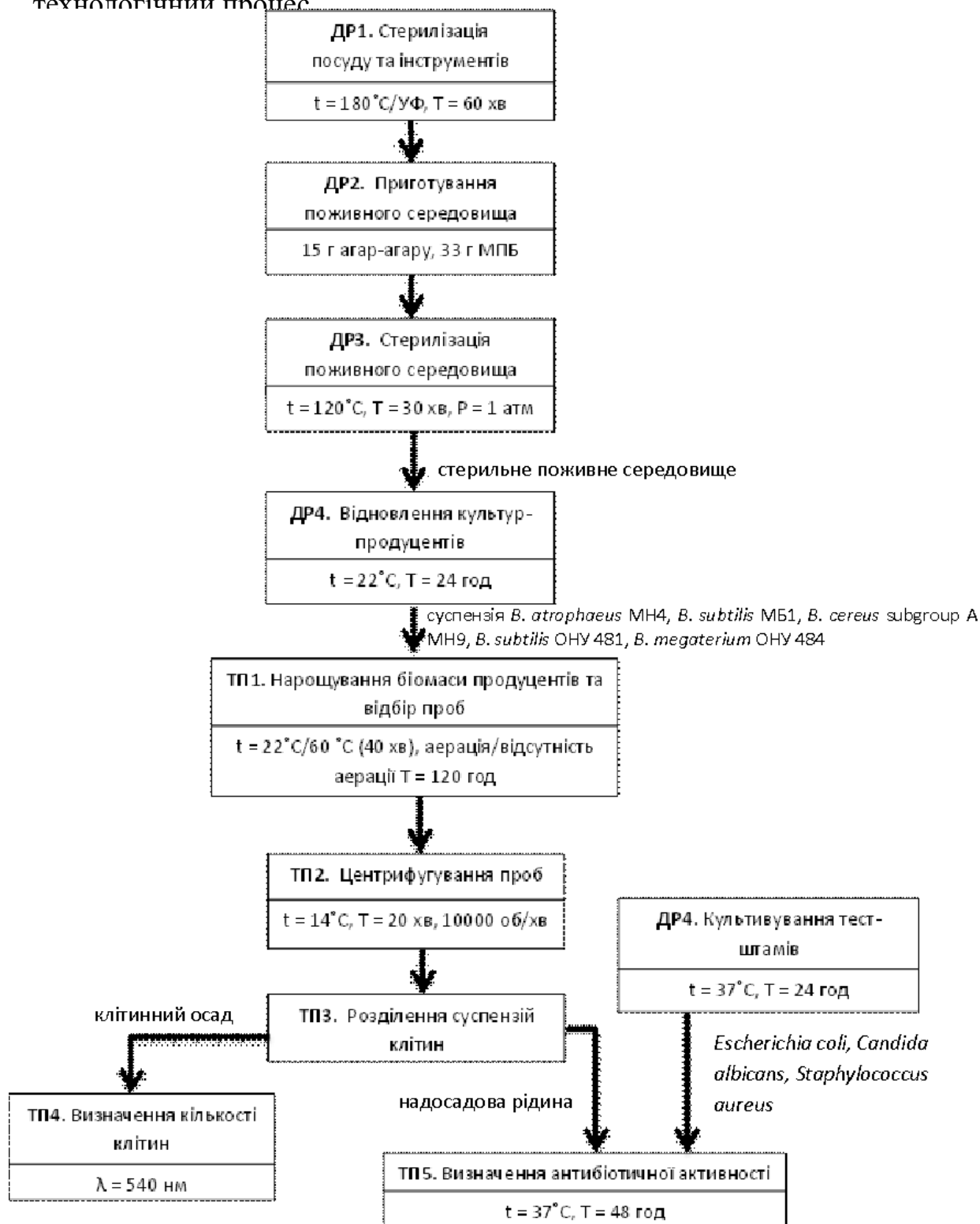


Рис. 2 Біотехнологічна схема отримання екзометаболітів бацил, що була використана в дослідженні: ДР - допоміжні роботи; ТП - технологічний процес



10.05.22

(дата)

Юлія ПОШЕЛЮЗНА