

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота**

**бакалавра**

**на тему: «Синтез антибіотичних речовин представниками  
роду *Bacillus* за умов утворення ними біоплівки»**

---

*«Synthesis of antibiotics by the Bacillus genus representatives  
under the biofilm formation»*

**Виконала:** студентка IV курсу  
денної форми навчання  
Спеціальність 162 Біотехнології та  
Біоінженерія  
**Єлизавети КОВАЛЕНКО**

**Науковий керівник**  
кандидат біологічних наук, доцент  
Марія РУСАКОВА

**Рецензент:**  
кандидат біологічних наук, доцент  
Ганна МАЙКОВА

Рекомендовано до захисту:  
Протокол засідання кафедри  
№ \_\_\_\_\_ від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ р.

Захищено на засіданні ЕК № \_\_\_\_\_  
Протокол № \_\_\_\_\_ від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ р.  
Оцінка \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал )

Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ **Тетяна ФІЛІПОВА**  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Голова ЕК  
\_\_\_\_\_ **Ганна ЯМБОРКО**  
(підпис) (прізвище та ініціали)

Одеса-2022

## АНОТАЦІЯ

Досліджено антибіотичну активність екзометаболітів, що продукуються штамми *Bacillus subtilis* ОНУ 481, *Bacillus megaterium* ОНУ 484, *Bacillus atrophaeus* МН4, *B. subtilis* МБ1 щодо тест-мікроорганізмів *E. coli* АТСС 25922 та *S. aureus* АТСС 25923.

В роботі було визначено строки окремих фаз розвитку досліджуваних штамів, зокрема стаціонарної. Більш виражену протимікробну активність біологічно активні речовини, які утворювались досліджуваними бацилами, проявляли щодо представника грампозитивних мікроорганізмів – *S. aureus*.

Роботу викладено на 34 сторінках, вона містить 2 таблиці, 4 рисунки та 1 схему. Наведено посилання на 47 джерел літератури (25 кирилицею та 22 латиницею).

**Ключові слова:** *Bacillus* sp., антибіотики, вторинні метаболіти, біотехнологія

The antibiotic activity of exometabolites produced by strains of *Bacillus subtilis* ONU 481, *Bacillus megaterium* ONU 484, *Bacillus atrophaeus* MN4, *B. subtilis* MB1 towards test microorganisms *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 was studied.

The terms of separate development phases of the studied strains, in particular stationary, were determined. If we compare the results of the research, we can see that the more expressed antimicrobial activity of biologically active substances formed by the studied bacilli was shown due to the gram positive microorganism – *S. aureus*.

The work is presented on 34 pages, it contains 2 tables, 4 figures and 1 diagram. References are made to 47 sources of literature (25 in Cyrillic and 22 in Latin).

**Key words:** *Bacillus* sp., antibiotics, secondary metabolites, biotechnology

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	6
1.1. Мікроорганізми як об'єкти біотехнології .....	6
1.2. Загальна характеристика представників роду <i>Bacillus</i> .....	8
1.3. Біологічно активні речовини з антимікробними властивостями, що продукуються бактеріями роду <i>Bacillus</i> .....	10
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	15
2.1. Досліджувані мікроорганізми та умови їх попереднього культивування .....	15
2.2. Отримання біоплівки досліджуваних мікроорганізмів .....	16
2.3. Визначення протимікробної активності речовин, які утворювались досліджуваними бактеріями роду <i>Bacillus</i> .....	17
2.4. Експериментальна схема біотехнологічного отримання біологічно активних речовин з антибіотичною активністю та використане в дослідженні обладнання .....	18
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	21
3.1. Характеристика роду досліджуваних штамів мікроорганізмів ...	21
3.2. Характеристика протимікробної активності екзаметаболітів, що утворились досліджуваними штамами бацил .....	25
ВИСНОВКИ .....	28
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ .....	29

## ВСТУП

В даний час в науковій літературі є недостатня кількість публікацій, присвячених питанням вивчення і біотехнологічного виробництва різних видів біологічно активних речовин, що продукуються переважно спороутворюючими мікроорганізмами роду *Bacillus*. В основному увагу дослідників привернуто на деякі конкретні види біологічно активних речовин, способи їх виділення, опис фізико-хімічних і біохімічних властивостей, рідше – на їх специфічний вплив і фізіологічну значимість щодо різних тканин, органів і систем людського організму [Berdy, 2005]. Велику кількість робіт присвячено також питанням отримання в промислових масштабах деяких біологічно активних речовин, в основному антибіотиків, амінокислот і ферментів [Barbosa, 2015]. Одночасно, в цілому, проблема системного вивчення метаболітів відповідних бактерій в силу своєї складності ще досить далека від остаточного рішення. Це стосується питань синтезу біологічно активних речовин за різних умов культивування мікроорганізмів, якісного і кількісного складу компонентів поживних середовищ, вдосконалення способів виділення, очищення [Copeland, 1994].

Бактерії роду *Bacillus* викликають великий інтерес мікробіологів з приводу повсюдного поширення представників цього роду, циклу розвитку, незвичайної стійкості їх спор до хімічних і фізичних агентів і патогенності [Егорова, 2008]. Незважаючи на інактивацію метаболізму, спори залишаються здатними до безперервного контролю стану навколишнього середовища і швидко реагують на надходження відповідних поживних речовин, проростаючи і відновлюючи вегетативний ріст. Спори у стані спокою виявляють неймовірну довговічність і можуть бути виявлені фактично в будь-якому типі середовища існуючих на Землі [Горбатюк, 2009].

Рід *Bacillus* – це одна з найбільш різноманітних і комерційно корисних груп мікроорганізмів. Здатність деяких штамів витримувати високі або низькі температури і високі або низькі значення рН зробила їх важливими джерелами отримання комерційних препаратів ферментів [Егорова, 2008].

Вивчення бацил ведеться в різних галузях, починаючи від харчової промисловості і закінчуючи біотехнологією і генною інженерією. Але бактерії роду *Bacillus* представляють інтерес і в екологічних дослідженнях, так як населяють різні місця існування. Очевидно, що антропогенний натиск, який відчуває сучасне довкілля, так само може впливати на мінливість цих мікроорганізмів [Воробьева, 2003]. В даний час штами бацил використовуються для отримання продуктів чотирьох типів: ферментів; антибіотиків; високоочищених препаратів, включаючи підсилювачі запаху і харчові добавки; інсектициди [Дикий, 2004].

**Мета** дослідження полягала у визначенні антибіотичної активності та складання біотехнологічної схеми отримання екзометаболітів, що продукуються штамми *Bacillus subtilis* ОНУ 481, *Bacillus megaterium* ОНУ 484, *Bacillus atrophaeus* МН4 та *B. subtilis* МБ1.

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

1. Визначити фази розвитку та термін початку стаціонарної фази для досліджуваних штамів бацил.
2. Визначити спектр протимікробної активності екзометаболітів, що синтезуються досліджуваними штамми бацил.
3. Встановити найбільш ефективний термін для обробки культуральної рідини для отримання найбільш активних екзометаболітів досліджуваних штамів мікроорганізмів.

Встановити серед досліджуваних штамів бацил найбільш активного продуцента екзометаболітів з протимікробними властивостями.

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

**Предмет дослідження** - рівень антибіотичної активності екзометаболітів, концентрація клітин.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Мікроорганізми як об'єкти біотехнології

Найважливішими компонентами біотехнологічних процесів, що визначають отримання цільового продукту, є біологічні агенти. Номенклатура використовуваних в біотехнологічній практиці біологічних агентів різноманітна і неухильно розширюється [Егорова, 2008]. Сучасні біотехнологічні виробництва базуються на використанні наступних груп біологічних агентів [Самуйленко, 2013]:

- клітин мікроорганізмів;
- рослинні і тваринні тканинних клітин, клітин тканин людини;
- компонентів клітин (протопластів, мембран, мітохондрій, хлоропластів і ін.);
- рекомбінантів, отриманих методами генетичної інженерії;
- позаклітинних продуктів (ферментів, коферментів);
- вірусів.

У виробничій практиці найбільш широко використовується традиційний біологічний агент – мікробна клітина. Виявляються всі нові види мікроорганізмів, які можуть бути використані в біотехнології як продуценти корисних речовин [Мосічев, 1998].

Набір біологічних агентів безперервно поповнюється новими, нетрадиційними об'єктами, з'являються нестандартні біотехнологічні процеси. Особлива увага в даний час приділяється створенню не існують в природі біологічних агентів методами генетичної інженерії [Виестур, 2007]. Сформувався напрям конструювання штучних клітин.

Але все ж основою сучасної промислової біотехнології в даний час є мікробіологічний синтез, в якому використовуються різні групи мікроорганізмів для отримання широкого асортименту продуктів (рис. 1) [Гриневич, 2007].



**Рис. 1. Спектр біологічно активних сполук, що синтезуються бактеріями [Гриневиц, 2007]**

Найважливішими перевагами мікробіологічного синтезу є використання дешевої сировини, часто у вигляді промислових відходів, можливість синтезу складних органічних сполук в одну стадію в м'яких умовах (низька температура, невисокий тиск). Ефективність мікробіологічного синтезу визначається перш за все можливостями мікроорганізмів – продуцентів цільових продуктів [Balouiri, 2015 ; Ярыгин, 2019].

До промислових продуцентів пред'являються певні вимоги, в числі яких [Станишкис, 1994]:

- висока швидкість росту;
- непатогенних штамів, нетоксичність біомаси;
- термотолерантність;
- високий вихід біомаси (або метаболіти) від субстрату;
- фагостійкість;
- легкість виділення клітин з культуральної рідини;
- конкурентоспроможність, стійкість в процесі безперервного культивування;
- можливість культивування в нестерильних умовах;
- мінімальне накопичення другорядних продуктів метаболізму в культуральній рідині.

Таким чином, мікроорганізми у біотехнологічному виробництві характеризуються найбільш широким спектром біологічно активних речовин, які знайшли застосування у різних сферах промисловості та людської діяльності.

## 1.2. Загальна характеристика представників роду *Bacillus*

Бактерії роду *Bacillus* одна з найбільш великих груп мікроорганізмів. Рід *Bacillus* привертає велику увагу дослідників і практиків з різних галузей.

Зібрані знання з різних наук вказують на спроможність представників роду *Bacillus* виступати як продуценти біологічно активних речовин: ферментів, антибіотиків, інсектицидів . Висока пристосованість до різних умов існування (наявність або відсутність кисню, зростання і розвиток в значному діапазоні температур і т.п.) сприяють поширенню бацил в ґрунті, воді, повітрі, харчових продуктах та інших об'єктах зовнішнього середовища [Ярыгин, 2019].

Рід *Bacillus* включає 377 видів (останнє оновлення в січні 2019 року) та об'єднує велику групу аеробних грампозитивних хемоорганотрофних мікроорганізмів. Типовим видом є *B. subtilis* - один з найбільш вивчених мікроорганізмів [Пирог, 2010].

Таксономія бацил: Домен: *Bacteria*, Відділ : *Firmicutes*, Клас: *Bacilli*, Порядок: *Bacillales*, Родина: *Bacillaceae*, Рід: *Bacillus*.

Рід *Bacillus* об'єднує бактерії за наступними ознаками:

- 1) прямі або майже прямі паличкоподібні бактерії, розміри яких  $0,3-2,2 \times 1,2-7,0$  мкм;
- 2) рухливі з перитріхально розташованими джгутіками;
- 3) утворюють стійкі до факторів навколишнього середовища ендоспори [Пирог та ін., 2010].

Рід *Bacillus* є убіквітарним, зустрічаються в ґрунті, воді, пилу і повітрі. Їх здатність утворювати ендоспори, різноманітність фізіологічних властивостей, а також здатність виробляти численні антимікробні сполуки



сприяють їх широкому поширенню в ґрунті, водному середовищі, харчовій і кишкової мікробіоті членистоногих і ссавців [Abrieoul et al., 2011].

Чотири групи видів (*B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* та *Bacillus amyloliquefaciens*) були відкриті більше 40 років тому. Відтоді еволюція їх молекулярних, хемотаксономічних та фізіологічних характеристик призвела до регулярних переоцінок і (пере)опису численних нових видів і підвидів [Bueno et al., 2010].

Бактерії з групи *Bacillus subtilis* складаються з дрібних клітин, для яких штам *B. subtilis subsp. subtilis* 168 розглядається як модельний організм [De Clerck, 2002]. Зазвичай вони мезофільні та нейтрофільні, хоча деякі можуть переносити високий рН.

Рід *Bacillus* – одна з найбільш різноманітних і комерційно корисних груп мікроорганізмів, що викликає великий інтерес мікробіологів через значне поширення представників цього роду, циклу розвитку, незвичайної стійкості їх спор до хімічних і фізичних агентів та патогенності, та робить їх важливими джерелами отримання комерційних препаратів (ферменти, антибіотики, підсилувачі запаху і харчові добавки, і інсектициди).

Впродовж значного періоду визнавали потенціал штамів групи *B. subtilis* до продукції широкого спектру вторинних метаболітів, що опосередковують антибіоз. Зараз підраховано, що для будь-якого даного штаму групи *B. subtilis* щонайменше 4-5% його геному визначає вироблення антимікробних сполук [Geoffry, 1981].

Види роду *Bacillus* відомі синтезом вторинних метаболітів з високим і різноманітним спектром біологічної активності. За кількістю продукції антибіотичних речовин є другими мікроорганізмами після актиноміцетів [Wang et al., 2015].

За останній час застосування представників групи *Bacillus subtilis* відбувається як у харчових процесах, так і в галузі захисту рослин. Їх здатність утворювати ендоспори, що виживають, і безліч антимікробних сполук, які вони виробляють, викликали підвищений промисловий інтерес як

для створення на їх основі харчових консервантів, терапевтичних засобів та біопестицидів.

### **1.3. Біологічно активні речовини з антимікробними властивостями , що продукуються бактеріями роду *Bacillus***

Спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* є продуцентами широкого спектра біологічно активних речовин: антибіотики, ферменти, регулятори росту, вітаміни, амінокислоти та інші сполуки з антимікробними та ростостимулюючими властивостями. Здатність бацил до синтезу речовин антибіотичної природи – один з ключових чинників, що визначають природу їх антагонізму до патогенів.

Основні продуценти антибіотиків цього роду: *B. brevis* (наприклад, граміцидин, тиротрицин), *Bacillus cereus* (наприклад, церексин), *Bacillus laterosporus* (латероспорин), *Bacillus licheniformis* (бацитрацин), *Bacillus polymyxa* (поліміксин, колістин), *Bacillus subtilis* (бацитрацин, мікобацилін, субтілін). Як прийнято вважати, ці антибіотики в основному є поліпептидами [Guoqing, 2019].

Молекулярно-генетичний аналіз і послідовність ДНК показали, що гени біосинтезу антибіотиків бацил кластеризуються в поліцистронні одиниці транскрипції і знаходяться під контролем глобальних регуляторних систем, які керують експресією генів, та індукуються, коли клітини бацил вступають у стаціонарну фазу росту.

Одна з класифікацій розрізняє біоактивні метаболіти, що утворюються бацилами, на основі їх біосинтетичних шляхів та хімічної природи: тобто рибосомні пептиди (RPs), леткі сполуки, полікетиди (PKs), нерибосомні пептиди (NRPs) та гібриди між PKs та NRPs. Для кожної класифікації описано та наведено приклади хімічної структури, біосинтезу та протимікробної активності.

Ці молекули в основному є антимікробними пептидами. Їхні структури, як правило, циклічні, гідрофобні та містять специфічні фрагменти, такі як

D-амінокислоти або внутрішньо молекулярні тіоефірні зв'язки. Через широку різноманітність цих молекул їх класифікація є досить складною і може ґрунтуватися на кількох критеріях, таких як їх біосинтетичний механізм, джерела, біологічні функції, властивості, тривимірна структура, структура ковалентного зв'язку або молекулярні мішені [Wang et al., 2015.] Одна з основних класифікацій антимікробних молекул групи *B. subtilis* ґрунтується на основі їх шляхів біосинтезу та їхньої хімічної природи: рибосомні пептиди (бактеріюцини та ферменти), полікетиди, нерибосомальні пептиди та леткі речовини.

Біосинтез нерибосомальних пептидів здійснюється мультиензимними комплексами (нерибосомальні пептидсинтетази). Ці комплекси організовані за модульним принципом, послідовність амінокислотних залишків в пептиді, що синтезується, визначається послідовністю амінокислотних залишків самих нерибосомальних пептидсинтетаз. Ускладнені структури нерибосомальних пептидів запобігають гідролізу антибіотиків протеолітичними ферментами, створюють просторові структури, що дозволяють взаємодіяти з мішенню. Утворення пептидних антибіотиків у бацил контролюється азотною і вуглецевою репресією, зниження синтезу спричиняється зміною рН середовища та утворенням із глюкози оцтової і піровиноградної кислот [Wang et al., 2015].

Необхідними умовами для синтезу антибіотиків є амінокислоти, аденозин-5-трифосфат, іони Mg [Babasaki et al., 2017].

За напрямом антимікробної активності антибіотики, синтезовані цими мікроорганізмами поділяються на:

1. Антибіотики широкого спектру дії. До цієї групи відносяться широко розповсюджені препарати. Наприклад, бацилін отриманий з культури *B. subtilis*, що пригнічує розвиток грампозитивних *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus albus*, *Symphyotrichum lanceolatus* і грамнегативних мікроорганізмів *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Pasterella* spp.;

Бацитрацин – суміш поліпептидів-інгібіторів клітинної стінки бактерій, виділені з культури *B. licheniformis* з бактерицидною активністю. Крім використання у ветеринарії, бацитрацин можна застосовувати в невеликих концентраціях профілактично та як стимулятор росту при вирощуванні та відгодівлі тварин та птиці [Rukmini et al., 2015, Hussein et al., 2016].

Тиротрицин, що синтезується культурою *B. brevis*, активний переважно щодо стафілококів, стрептококів, пневмококів; *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., нейсерій, клостридій, деяких грамнегативних бактерій (*Pseudomonas* spp., *Proteus* spp.), грибків (у тому числі *Candida* spp.) та трихомонад .

Субтілін був отриманий з культури *B. subtilis* NRRL-B 545. Це пептидний антибіотик, що містить лантіонін (лантібіотик). Бактерицидна активність подібних речовин заснована на деполаризації бактеріальних цитоплазматичних мембран та утворенні водних трансмембранних пор [Parisot et al., 2008]. Високоактивний проти *S. aureus*, *Treponema pallidum*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *Neisseria* spp., *Mycobacterium tuberculosis*. Додаванням невеликих доз цього антибіотика дозволяє значно зменшити час стерилізації харчових продуктів, що забезпечує збереження природного забарвлення продуктів, тому його успішно використовують як консервант у промисловості, зокрема при консервуванні овочів та фруктів [Barbosa et al., 2015].

2. Активні проти грампозитивних бактерій: атеррімін, який утворюється штамом *B. subtilis* var. *aterrimus*; бациліпіни, бацилізіни з культури *B. subtilis*.

3. Активні проти грамнегативних бактерій. Граміцидин бактерицидно активний щодо стрептококів, стафілококів, пневмококів та інших мікроорганізмів та синтезується *B. brevis*. Діюча речовина - граміцидин С, що продукує *Bacillus brevis* var. *G.-B*. Штам в процесі розвитку в рідкому поживному середовищі та при висіві на щільні поживні середовища з дріжджовим екстрактом може утворювати різні за морфологією та деякими

іншими властивостями колоній: складчасті (R), гладкі (S) і дві плоскі (P + і P-) форми, що залежить від умов культивування. Утворювати грамїцидин С можуть лише форми R і P+ [Thasana, 2010].

Поліміксини, подібно до катіонних детергентів, порушують осмотичну цілісність клітинних мембран шляхом взаємодії з ліпополісахаридами і фосфоліпідами зовнішньої мембрани. Поліміксин В синтезується культурою *B. polymyxa* та активний щодо представників родів *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, а також *Bordetella pertussis*, *H. influenzae*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*. Зазвичай стійкі *Serratia marcescens*, *Providencia* spp., *Bacteroides fragilis*. Але резистентність до поліміксину розвивається рідко, в зв'язку з чим вони зберігають активність щодо полірезистентних штамів *P. aeruginosa* і *Enterobacteriaceae* spp. [Barbosa et al., 2015].

Бактеріцидний колістин (або поліміксин Е) - метаболіт *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*. До препарату чутливі грамнегативні бактерії *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., сальмонелли, шигелли, клебсієлли (у тому числі *Klebsiella pneumoniae*) [Sajitha et al., 2016].

#### 4. Протигрибкові антибіотики.

Це *Aspergillus*-фактор з культури *B. subtilis*; ітурін, що синтезується *B. subtilis* v. *ituricensis* та інгібує ріст і розвиток *Serratia marcescens*, *E. coli*, *S. aureus*, *Corynebacterium* spp., мікосубтілін - *Trichophyton* spp., *Torulasporea delbruckii*, *Microsporium audouini*, *Achorion schonleini*, *Cryptococcus neoformans*, *Roseomonas rubra*. Мікобацілін пригнічує ріст таких мікроскопічних грибків як *Aspergillus niger*, *Candida albicans* та грибів-фітопатогенів, тому засоби на його основі використовуються в області сільськогосподарської біотехнології.

Фунгістатин здійснює фунгістатичну, а у великих дозах - фунгіцидну дію на патогенні гриби і, особливо, на дріжджоподібні гриби роду *Candida*, а також на аспергили, *Trichophyton gypseum*, *Rhodotorula* spp.

Ризостоніа-фактор, отриманий з культури *B. subtilis* ATCC 6633 ефективний проти *Rhizoctonia solani*, *Rothium* spp., *Rhizoctonia bataticola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium digitatum* [Sajitha et al., 2016].

Отже, у зв'язку із зростанням проблеми резистентності мікроорганізмів до антимікробних засобів, останнім часом інтерес до цієї групи препаратів зростає. Але багато антибіотичних сполук, прототипами яких є штами *B. subtilis*, ще потребують подальшого вивчення.

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Досліджувані мікроорганізми та умови їх попереднього культивування

Дослідження щодо визначення здатності окремих представників роду *Bacillus* продукувати антибіотичні речовини було здійснено на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології та в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова.

В експерименті були використані наступні штами, які було отримано з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова: *Bacillus atrophaeus* МН4, *B. subtilis* МБ1, що виділено з гідробіонтів Чорного моря, а також *Bacillus subtilis* ОНУ 481, *Bacillus megaterium* ОНУ 484.

Для попереднього відновлення штамів та підтримки їх росту було використано поживне середовище м'ясо-пептонний агар (МПА). Склад даного середовища відповідав наступному: до готового розчину м'ясо-пептонного бульйону (МПБ, наступного складу: пептон ферментований, екстракт м'ясний, Натрію хлорид) додавали 2 % агар-агару та залишали до набухання впродовж 30 хвилин. Кип'ятили до повного розчинення агару, після чого стерилізували при 120 °С [Harley et al., 2002]. Також в роботі було використано рідке поживне середовище – м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) – для основного етапу культивування [Zhenxiang et al., 2018]:

Для попередження контамінації сторонніми мікроорганізмами використані в експерименті поживні середовища, а також весь скляний посуд було простерилізовано при підвищеній температурі: із застосуванням автоклаву або сухожарової шафи. Обеззараження полістиролових планшетів, в яких було здійснено культивування досліджуваних штамів бацил з метою отримання їх біоплівки, здійснювалось з використанням УФ-опромінення та 70%-го розчину етилового спирту.

Використані в дослідженнях мікроорганізми попередньо культивувались на щільному середовищі МПА в термостаті при 25 °С впродовж 24 годин. З отриманих культур готували клітинні суспензії, для чого використовували стерильний фізіологічний розчин. Оптична густина відповідних суспензій, яку було зафіксовано з використанням стандарту за МакФарландом, відповідала  $1,5 \cdot 10^8$  КУО/мл [Богомолів, 2005].

## **2.2. Отримання біоплівки досліджуваних мікроорганізмів**

Біоплівка – форма існування мікроорганізмів на межі розділу фаз, зокрема «щільна поверхня – рідина», що характеризується певними специфічними рисами, які відрізняються від таких для суспензійної культури. Однією з таких розбіжностей є продукція біологічно активних сполук, наприклад, протимікробної дії.

Для того, щоб з'ясувати можливість продукції досліджуваними мікроорганізмами речовин під час утворення біоплівки в роботі здійснювали їх культивування у лунках планшету, до стінок яких прикріплювались клітини бацил, формуючи угруповання.

Для цього з кожної попередньо підготовленої суспензії відбирали по 0,02 мл і вносили у відповідні лунки стерильного 48-лункового планшету. Кожна лунка вже на цей момент містила по 1,0 мл рідкого поживного середовища МПБ. Інкубацію зразків проводили при температурі 25 °С впродовж 5 діб.

Впродовж культивування кожену добу проводилось визначення кількості клітин, як у суспензіях, так й у складі біоплівки, а також досліджувалась протимікробна активність на доосадової рідини.

Визначення кількості мікроорганізмів здійснювали за допомогою вимірювання оптичної густини [Бортников, 1992]:

- у суспензійній культурі при довжині хвилі 540 нм;
- у складі біоплівки після забарвлення кристалічним фіолетовим при довжині хвилі 582 нм.



Для порівняння здатності продукції досліджуваними мікроорганізмами сполук з антибіотичними властивостями також проводили культивування штамів бацил у скляних флаконах при постійному перемішуванні, що обумовлювало ріст клітин здебільше у вигляді суспензії, тобто у неприкріпленому стані.

Для кожної культури розраховували середнє арифметичне кількості КУО/мл поживного середовища як показник накопичення мікробної біомаси за допомогою калібрувальної кривої.

### **2.3. Визначення протимікробної активності речовин, які утворювались досліджуваними бактеріями роду *Bacillus***

Для отримання показників ефективності біологічно активних речовин досліджуваних мікроорганізмів щодо інших культур проводилось вилучення зразків надосадової рідини у кожному варіанті експерименту.

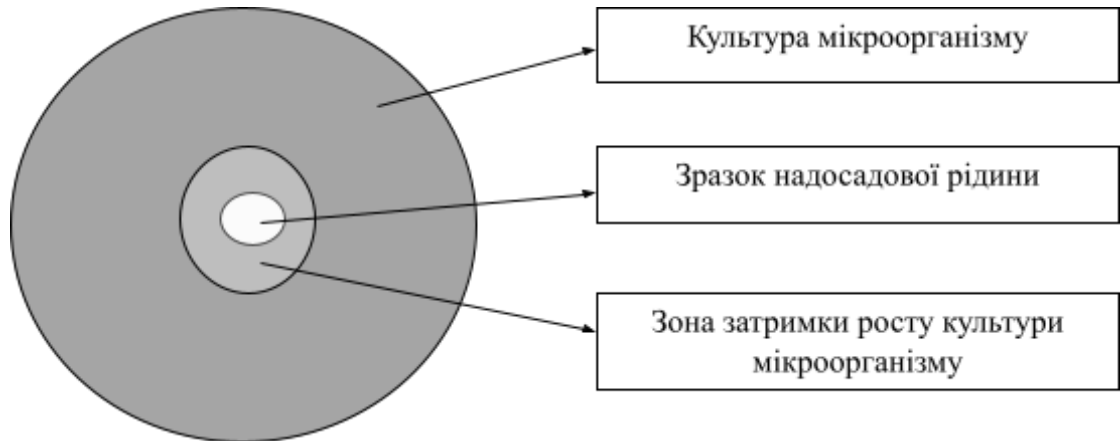
Кожну пробу надосадової рідини, як при культивуванні у планшеті, так й у скляних флаконах, центрифугували впродовж 20 хвилин при 10000 g та температурі 14 °C. Надалі використовували отриману надосадову рідину [Помазкіна, 2014; Meyers et al., 2018].

За тест-мікроорганізми для визначення антибіотичної активності екзометаболітів досліджуваних бацил було використано штами тест-мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, що були отримані з колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ ім. І. І. Мечникова.

Перевірку антибіотичної активності екзаметаболітів, що синтезуються досліджуваними штамми, було проведено за допомогою методу лунок в агарі (рис. 2).

Для цього в чашки Петрі в стерильних умовах заливали щільне поживне середовище МПА. Після застигання середовища, на його поверхню наносили відповідні індикаторні мікроорганізми, формуючи суцільний газон. На наступному етапі в шарі агаризованого середовища стерильним

пробоечним свердлом вирізали лунки діаметром 5-7 мм, які відповідали відповідним термінам відбору зразків. В них вносили по 0,2 мл відповідних зразків надосадової рідини.



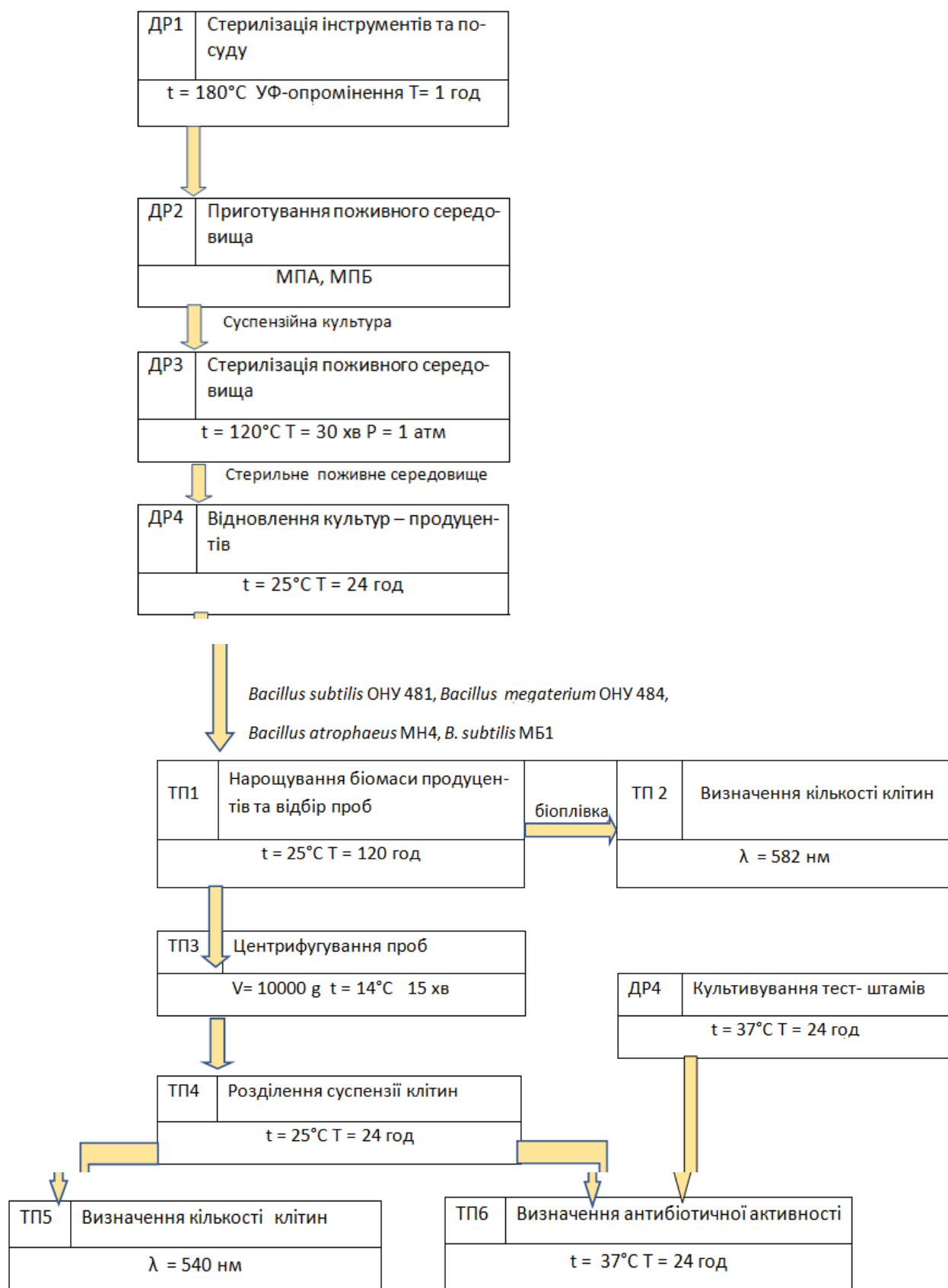
**Рис 2. Схематичне зображення методу лунок у щільному поживному середовищі [Чернивец, 2010]**

Чашки Петрі витримували в термостаті впродовж 2 діб при температурі 37 °С, вимірюючи зону пригнічення росту тест-штаму навколо лунки. Відсутність росту мікроорганізмів, тобто величину діаметру зони затримки росту (у мм) розраховували як середнє арифметичне трьох вимірів випадково обраних проекцій. При оцінці отриманих результатів їх інтерпретували як: малоактивна ( $\leq 10$  мм), середньо-активна (11–14 мм) та високоактивна ( $\geq 15$  мм) [Чернивец, 2010].

Для кожного варіанту кількість повторів складала 5.

#### **2.4. Експериментальна схема біотехнологічного отримання біологічно активних речовин з антибіотичною активністю та використане в дослідженні обладнання**

Для отримання сполук із антибіотичною активністю, які утворювались досліджуваними штамами бацил, було складено схему, представлену на рисунку 3.



**Рис. 3. Біотехнологічна схема отримання екзометаболітів бацил, що була використана в дослідженні**

В процесі роботи по визначенню антибіотичної активності біологічно активних сполук, які продукуються досліджуваними бацилами, 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 глибинного 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 ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Характеристика росту досліджуваних штамів мікроорганізмів за різних форм існування

З огляду на високий біосинтетичний потенціал В роботі було проведено вивчення процесу розвитку бацил в лунках полістиролового планшету на межі розділу фаз (щільна поверхня – рідина), а також у товщі поживного середовища. бактерій роду *Bacillus* актуальним завданням є комплексні дослідження перспективних продуцентів низки біологічно активних речовин, а також вивчення природи цих екзометаболітів та їхньої ролі у прояві біологічної активності штамів, здатних до синтезу різних речовин.

Серед бактерій роду *Bacillus* – велика кількість штамів, що синтезують біологічно активні екзометаболіти: ферменти, пігменти, полісахариди, поліаміни тощо. Завдяки своїм властивостям штами-продуценти можуть використовуватися при створенні на їхній основі чи на основі їхніх екзометаболітів пробіотиків і пребіотиків, препаратів для очищення питної та стічної вод, препаратів із детоксикаційною, імуностимулюючою та протипухлинною активностями, засобів біологічного контролю захворювань рослин тощо [Avtsinov, 2018].

У мікроорганізмів продукція біологічно активних сполук залежить від фази росту.

На першому етапі дослідження було визначено кількість клітин під час культивування у вигляді двох фізіолого-морфологічних формах: суспензії та біоплівки (табл. 1, рис. 4).

Як видно з представлених у таблиці 1 результатів, досліджувані штами бацил досить швидко пристосувались до умов культивування. Вже на першу добу було зафіксовано зростання оптичної густини відповідних зразків. При цьому, накопичення біомасу клітин, які існували у вигляді суспензійної культури, відбулося більше ніж у 6 разів у порівнянні з початком експерименту. Також досить значне підвищення вмісту клітин відбувалося й

на другу та третю добу. У цьому випадку коефіцієнт зростання досягав 1,5 – 2 рази для всіх досліджуваних штамів [Грундинг, 2007 ; Забокрицкий, 2014].

Таблиця 1

**Інтенсивність росту досліджуваних штамів бацил за різних умов розвитку у товщі поживного середовища\***

Доба культивування	Досліджувані штами			
	<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484
<u>суспензійна культура</u>				
0	0,045			
1	0,271	0,304	0,286	0,325
2	0,437	0,521	0,469	0,512
3	0,587	0,739	0,963	1,062
4	0,593	0,813	1,181	1,024
5	0,602	0,806	1,115	0,998
<u>у вигляді біоплівки</u>				
0	0			
1	0,124	0,147	0,115	0,106
2	0,308	0,396	0,347	0,273
3	0,564	0,468	0,714	0,669
4	0,889	0,923	1,247	1,014
5	0,928	1,026	1,232	1,206

Примітка: \* – дані представлені у вигляді оптичної густини при довжині хвилі 540 нм (суспензійна культура ) та 582 нм ( біоплівка ) .

Починаючи з четвертої доби й до закінчення культивування, біомаса суспензійної культури , навпаки , практично не змінювалась.

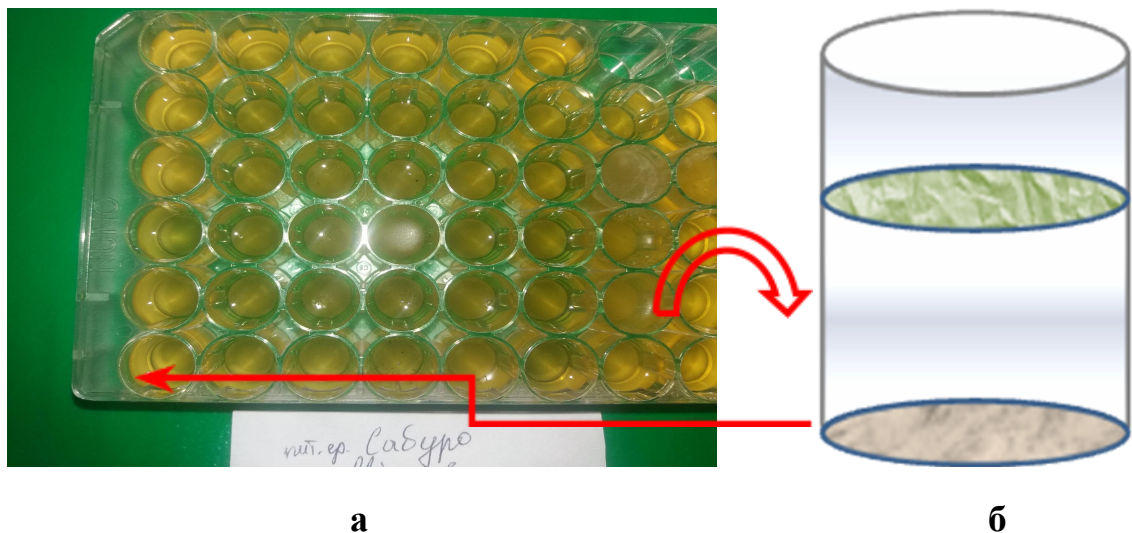
Найбільш виражені зміни відповідного показника не перевищували 20 % у порівнянні з попереднім строком культивування у випадку штаму *B. subtilis* ОНУ 481.

Отже, аналізуючи отримані данні можна побачити, що розвиток суспензійної форми існування досліджуваних мікроорганізмів здійснювався поступово, згідно змінам, що відбувалися: збільшення щільності клітин у популяції, зниження концентрації поживних речовин та накопичення продуктів обміну. За час культивування відбувається послідовна зміна деяких фаз: лаг-, експоненціальної, стаціонарної та відмирання. Кожна фаза характеризується окремими фізіологічними параметрами. Лаг-фаза – це фаза «звикання» клітин до середовища, при цьому відбувається збільшення кількості ДНК та РНК, та індукція синтезу відповідних ферментів. Лаг-фаза продовжується, якщо брати старий посівний матеріал та переносити клітини в нове за складом середовище. Лаг-фаза скорочується (або може бути зовсім відсутня), якщо активні молоді клітини перенести до свіжого середовища того самого складу та той же температури. В середовищах, які мають у складі два або більше видів субстратів, спостерігається діауксія, при якій після вичерпування одного субстрату культура переходить на другу лаг-фазу. В експоненціальній фазі клітини ростуть та діляться з максимальною швидкістю, їх ріст не обмежений. Зазвичай такі клітини використовуються в біохімічних та фізіологічних дослідженнях [Copeland, 1994]. По мірі вичерпування субстратів та накопичення продуктів обміну швидкість зростання знижується (наступає фаза сповільненого росту) і культура переходить до стаціонарної фази, під час якої процеси поділу та відмирання клітин в популяції знаходяться в динамічній рівновазі, коли процеси розмноження та відмирання клітин в популяції врівноважені. Для бактерій ця фаза досягається при концентрації клітин в середньому  $10^9$  клітин /мл. Коли вичерпані поживні речовини та накопичення продуктів метаболізму досягають порогових концентрацій, починається фаза відмирання та число

клітин в популяції поступово зменшується. Фаза відмирання зазвичай також має логарифмічний характер.

Таким чином, періодичну культуру досліджуваних штамів можна розглядати як замкнену систему існування, розвиток якої відбувається із послідовною зміною фаз.

Паралельно із суспензійною культурою у кожній лунці планшету де відбувається культивування досліджуваних штамів бацил, здійснювалось утворення біоплівки (рис. 4). Утворення біоплівок на поверхні полістиролового планшету – складний комплексний динамічний процес, що складається з декількох етапів: адгезії клітин до поверхні відбувається в результаті фізико-хімічних взаємодій між поверхневими структурами клітин і самого субстрату. Наступним етапом є перерозподіл клітинної маси; активне ділення клітин для створення клітинних кластерів; утворення екзополімерного слизового матриксу [Шевелуха, 2003].



**Рис. 4. Загальний вигляд планшету, в якому відбувалось культивування окремих представників роду *Bacillus* (середовище МПБ):**

а – полістироловий планшет; б – схематичне розташування клітин під час культивування.



Початкове прикріплення мікробної клітини до поверхні субстрату здійснюється за рахунок дії електростатичних, гідрофобних сил, сил Ван-дер-Вальса, неспецифічної адгезії. Таким чином на ранніх стадіях формування біоплівка мала вигляд окремих колоній, але зі збільшенням товщини біоплівки формувались її специфічні структури – порожнини, вирости, пори і канали, які згодом починали утворювати суцільний сітчастий шар. Така форма існування, як біоплівка, у природних умовах є більш розповсюдженою, ніж суспензійна культура [Дикий, 2004].

При цьому, формування асоціацій клітин на межі розділу фаз «рідина – щільна поверхня» також проходило досить інтенсивно. Так, вже на першу добу біомаса утворених біоплівок значно зросла, досягаючи максимальних значень на п'яту добу. На відмінність від суспензійного варіанту культивування накопичення клітин досліджуваних штамів у складі асоціацій відбувалося більш рівномірно. Приріст біомаси, якщо розраховувати його значення за добу культивування у проміжку між першою та четвертою, становив, в середньому, 2,5-4 рази. Також між досліджуваними штамми бацил суттєвих розбіжностей у цьому процесі зафіксовано не було.

На п'яту добу формування біоплівки було зафіксовано гальмування росту біоплівок: відповідні показники, порівняно з попереднім етапом, збільшилися лише приблизно на 15-20 % [Грачева, 2000].

Отже, зростання біоплівки досліджуваних мікроорганізмів здійснювалось з послідовною зміною певних фаз, але їх тривалість відрізнялась від таких у суспензійної культури.

Також криві періодичного росту досліджуваних бактерій роду *Bacillus* мали «некласичний» вигляд. Очевидно причинами цих відмінностей є наступні можливості перемикатися з дихання на бродіння (змішаний тип метаболізму), а також переміщення між суспензійною культурою та асоціацією клітин на межі розділу фаз «рідина-щільна поверхня» [Дикий, 2006].

### **3.2. Характеристика протимікробної активності екзаметаболітів, що утворились досліджуваними штамми бацил**

Синтез антибіотичних сполук є прикладом активного мікробного антагонізму – виду взаємодій, при якому один з мікроорганізмів повністю пригнічує або уповільнює зростання іншого, отримуючи при цьому конкурентну перевагу [García-Bayona et al., 2018]. Отже, вивчення цієї форми взаємодії є основою для отримання активних продуцентів біологічно активних сполук, зокрема антибіотиків.

Дуже важливою функціональною властивістю, що є характерною для штамів роду *Bacillus*, є здатність виробляти різні типи протимікробних сполук, що мають широкий спектр дії щодо грампозитивних, грамнегативних бактерій та дріжджоподібних грибів [Temilade et al., 2019].

На попередньому етапі роботи було визначено строки окремих фаз розвитку досліджуваних штамів, зокрема стаціонарної. Згідно з даними літератури саме стаціонарна фаза має значний вплив на процес утворення вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків [Copeland, 1994].

Отримані результати щодо протимікробної активності зразків надосадової рідини від поживного середовища, в якому відбувалось культивування бацил, представлені у таблиці 2.

Для порівняння було обрано зразки надосадової рідини з поживного середовища на третю та п'яту добу, тобто початок стаціонарної фази та її розвиток, відповідно.

Якщо порівнювати результати, то видно, що більш виражену протимікробну активність біологічно активні речовини, які утворилися досліджуваними бацилами, проявляли щодо представника грампозитивних мікроорганізмів – *S. aureus*.

При цьому найбільше значення діаметру зони затримки росту стафілококу було зафіксовано для штаму *Bacillus subtilis* ОНУ 481, але найменше *Bacillus megaterium* ОНУ 484. Така залежність спостерігалась, як у випадку впливу трьохдобової надосадової рідини, так й під час

дослідження п'ятидобових зразків. Але більш тривалий строк досліджуваних мікроорганізмів надавав більш виражений вплив [Бредихин, 2001] .

Таблиця 2

**Протимікробна активність екзаметаболітів досліджуваних штамів\***

Тест-мікроорганізм	Досліджувані штами бацил			
	<i>Bacillus atrophaeus</i> МН4	<i>Bacillus subtilis</i> МБ1	<i>Bacillus subtilis</i> ОНУ 481	<i>Bacillus megaterium</i> ОНУ 484
<b>ТРЕТЯ ДОБА</b>				
<i>S. aureus</i>	15 ± 1	17 ± 1	20 ± 2	12 ± 1
<i>E. coli</i>	0	10 ± 2	15 ± 2	9 ± 1
<b>П'ЯТА ДОБА</b>				
<i>S. aureus</i>	21 ± 2	28 ± 3	35 ± 5	19 ± 1
<i>E. coli</i>	9 ± 1	15 ± 2	15 ± 2	9 ± 1

Примітка: \* – дані представлені у вигляді діаметру зон затримки росту тест-мікроорганізмів, мм.

Очевидно, що більш пізні строки стаціонарної фази, яким відповідала п'ята доба культивування, визначали або більш високою концентрацією протимікробних сполук, або більш широким спектром таких речовин.

Що стосується ступеня активності щодо грамнегативного тест-мікроорганізму *E. coli*, то рівень пригнічення даного виду був менш вираженим. В цілому, діаметр зони затримки росту кишкової палички не перевищував 15 ± 2 мм. Також було визначено, що розбіжність в ефективності пригнічуваної дії між третьою та п'ятою добою немає .

Отже, екзометаболіти, які утворювалися досліджуваними мікроорганізмами проявили більш виражену протимікробну активність щодо культури грампозитивного золотистого стафілококу .

## ВИСНОВКИ

1. Тривалість окремих стадій розвитку досліджуваних мікроорганізмів була специфічною для кожного окремого штаму. При цьому стаціонарна фаза росту мікроорганізмів у суспензійній культурі *Bacillus atrophaeus* МН4, *Bacillus subtilis* МБ1, *Bacillus subtilis* ОНУ 481, *Bacillus megaterium* ОНУ 484 починалася на третю добу культивування.

2. Більш виражену протимікробну активність біологічно активні речовини, які утворилися досліджуваними бацилами, проявляли щодо представника грампозитивних мікроорганізмів *S. aureus*.

3. Було визначено що розбіжність в ефективності пригнічуваної дії між трьох- та п'ятьохдобовими екзометаболітами немає .

4. Найвищий ступінь антимікробної дії було продемонстровано екзометаболітами, які синтезуються впродовж всього п'ятидобового культивування штаму *B. subtilis* ОНУ 481.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Богомолов О. В. Курсове і дипломне проектування обладнання переробних і харчових підприємств / О. В. Богомолов, П. В. Гурський, В. П. Богомоллова. – Харків : Еспада, 2005. – 432 с.
2. Бортников И. И. Машины и аппараты микробиологических производств / И. И. Бортников, А. М. Босенко. – Минск : Высш. Школа, 1992. – 288 с.
3. Бредихин С. А. Технология и техника переработки молока / С. А. Бредихин. – Москва : Колос, 2001. – 400 с.
4. Виестур У. Э. Биотехнология. Биологические агенты, технология, аппаратура / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич. – Рига : Зинатне, 2007. – 263 с.
5. Воробьева А. А. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебн. пособ. для студ. мед. ВУЗов / А. А. Воробьева, А. С. Быкова // Медицинское информационное агентство. – 2003. – С. 236.
6. Горбатюк В. И. Процессы и аппараты пищевых производств / В. И. Горбатюк. – Москва : Колос, 2009. – 333 с.
7. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
8. Гриневич А. Г. Техническая микробиология / А. Г. Гриневич, А. М. Босенко. – Минск : Высшая школа, 2007. – 168 с.
9. Грундинг К. Г. Проектирование промышленных предприятий: Принципы, методы, практика. / К. Г. Грундинг. – М.: Бизнес Букс, 2007. – 340 с.
10. Дикий И. Л. Микробиология: Руководство к лабораторным занятиям. Учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / И. Л. Дикий, И. И. Сидорчук, И. Ю. Холупяк, Н. Е. Шевелёва, М. М. Великая, Н. А. Волкова, Л. Ф. Силаева, О. П. Стрилец, О. Г. Гейдерих. – Изд-во НфаУ : Золотые страницы. – 2002. – 444 с.

11. Дикий И. Л. Микробиология. Методические рекомендации для студентов фармацевтических высших учебных заведений / И. Л. Дикий, И. Ю. Холупяк, Н. Е. Шевелёва, М. М. Великая. – Москва : Колос, 2004. –144 с.
12. Дикий И. Л. Микробиология: Підручник для студентів / І. Л. Дикий, І. Ю. Холупяк, Н. Ю. Шевельова. – Харків : Професіонал, 2006. – 433 с.
13. Егорова Т. А. Основы биотехнологии / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина. – Москва : Издательский центр «Академия», 2008. – 208 с.
14. Забокрицкий Н. А. Обоснование направлений в разработке и экспериментальном изучении новых фармакологических препаратов на основе пробиотиков и их биологически активных продуктов: автореф. дисс. ... доктора медицинских наук : защищена 09.03.2014 / Н. А. Забокрицкий. – Челябинск, 2014. – 48 с.
15. Мосічев М. С. Загальна технологія мікробіологічних виробництв / М. С. Мосічев, А. А. Складаньов, В. Б. Котов. – Миколаїв : Легка і харчова промисловість, 1998. – 254 с.
16. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: Підруч. - 2-е вид., доп. і перероб. / Т. П. Пирог. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.
17. Помазкина А. А. Актуальные вопросы доклинического и клинического изучения нового лечебно-профилактического стоматологического средства дентозар / А. А. Помазкина, Н. А. Забокрицкий, Б. Г. Юшков, С. А. Кривопапов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – Т. 49, № 3. – С. 54–56.
18. Прозоркина Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. – Днепр : Феникс, 2013. – 378 с.
19. Самуйленко А. Я. Биотехнология: учебник / А. Я. Самуйленко. Москва : Наука, 2013. – 746 с.

20. Соколов В. Н. Аппаратура микробиологической промышленности / В. Н. Соколов. – Луцк : Машиностроение, 1999. – 278 с.
21. Станишкис Ю. Ю. Оптимальное управление биотехнологическими процессами. / Ю. Ю. Станишкис. – Винница : Москлас, 1994. – 254 с.
22. Стефанюк А. И. Реконструкция и техническое перевооружение предприятий пищевой промышленности. / А. И. Стефанюк. – Москва : Агропромиздат, 1990. – 110 с.
23. Феоктистова Н. В. Пробиотики на основі бактерій роду *Bacillus* у птахівництві / Н. В. Феоктистова, А. М. Марданова, Г. Ф. Хадієва, М. Р. Шаріпова // Вчені записки Казанського університету. – 2017. – Т. 159, № 1. – С. 85-107.
24. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин. – Москва : Высшая школа, 2003. – 469 с.
25. Ярыгин В. Н. Биология: учебник и практикум для среднего профессионального образования / В. Н. Ярыгин ; под редакцией В. Н. Ярыгина. – 2-е изд. – Москва : Издательство Юрайт, 2019. – 378 с.
26. Abrioel H. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocin / H. Abrioel, C. Franz // MicrobiolRev. – 2011. – V. 35. – P. 201-232.
27. Avtsinov I. A. Modeling of Periodic Process of Cultivation of Microorganisms / I. A. Avtsinov, N. Sukhanove, Yu. Kozhevnikov // Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tehničeskogo universiteta. – 2018. – Vol. 24, №1. – P. 116-123.
28. Babasaki K. A new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis / K. Babasaki, T. Takao, Y. Shimonishi, K. Kurahashi, A. Subtilosin // J. Bio Chem. – 2017. – V. 98, № 3. – P. 585-603.



29. Balouiri M. Antifungal activity of *Bacillus* spp. isolated from *Calotropis procera* AIT. Rhizosphere against *Candida albicans* / M. Balouri, S. Bouhdid, E. Harki // J. Pham. Clin. Res. – 2015. – V. 8. – P. 213-217.
30. Barbosa J. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. / J. Barbosa, T. Caetano, S. Mendo // J. Nat. Prod. – 2015. – V. 78, № 11. – P. 850-866.
31. Berdy J. Bioactive microbial metabolites / J. Berdy // J. Antibiot. – 2005. – V. 58. – P. 1-26.
32. Berghaus L. J. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equiequi* / L. J. Berghaus, S. Giguere, K. Guldbeck // J. Clin. Microbiol. – 2015. – V. 53. – P. 314-318.
33. Bueno S. M. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação / S. M. Bueno, A. N. Silva, C. H. Garcia-Cruz // Química Nova. – 2010. – Vol. 33, № 7. – P. 572-577.
34. Cockerill A. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically / A. Cockerill, R. Franklin // Approved Standard. – Vol. 9. – P. 4-22.
35. Copeland J. C. The *Bacillus subtilis* genome. Replication order and map position discrepancies. Evidence for a second origin / J. C. Copeland // Genetics. – 1994. – Vol. 78. – P. 1015-1034.
36. De Clerck E. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endospore forming genera / E. De Clerck, P. De Vos // Syst. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 25, № 4. – P. 611-617.
37. García-Bayona L. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities / L. Garcia-Bayona, L. Comstock // Science. – 2018. – V. 361, № 6408. – P. 995-1104.
38. Geoffry W. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized

carbon and nitrogen sources / W. Geoffry, A. Hanlon, A. Norman, A. Hodges // J. Bacteriology. – 1981. – V. 147, № 2. – P. 427-431.

39. Guoqing N. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology / N. Guoqing, T. Huarong // Trends in Microbiology. – 2019. – V. 23, № 2. – P. 110-119.

40. Hussein A. Identification of bacitracin produced by local isolate of *Bacillus licheniformis* / A. Hussein, S. Al-Janabi // Afr. J. Biotechnol. – 2016. – V.5. – P. 161-178.

41. Meyers A. Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications / A. Meyers, C. Furtmann, J. Jose // Enzyme Microbio Technol. – 2018. – Vol. 118. – P. 16–30.

42. Rukmini M. Production, purification and characterization of bacitracin from *Bacillus subtilis* / M. Rukmini, S. Debasish, D. Jikasmita, R. Ravitosh // J. Pharma Innovation. – 2015. – V. 3, № 12. – P. 77-82.

43. Sajitha K. Identification and characterization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* B1 against sapstain fungus of rubberwood through MALDI-TOF-MS and RT-PCR / K. L. Sajitha, A. D. Suma // Current Microbiology. – 2016. – V.73. – P. 46-53.

44. Temilade P. Antimicrobial Activity of *Bacillus Subtilis* Against Some Selected Food Borne Pathogens / P. Temilade, F. Ilesanmi // Current Microbiology. – 2019. – V. 2, № 7. – P. 89-99.

45. Thasana N. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtulene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated  $\beta$ -amino acid / N. Thasana, B. Prapagdee, N. Rangkadilok, R. Sallabhan, S.L. Aye, S. Ruchirawat, S. Loprasert // Letters. – 2010. – Vol. 584. – P. 3209–3214.

46. Wang T. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties / T. Wang, Y. Ling, M. Wu, Z. Chen, J. Lin, L. Yang // Chinese J. Chem. Eng. – 2015. – V. 23, № 3. – P. 754-768.

47. Zhenxiang L. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis* / L. Zhenxiang, G. Weina, L. Chang // Vet. Med. Sci. – 2018. – V. 80, № 3. – P. 427-433.

10.05.2022

(дата)

A small, square image showing a handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to be the name 'Elizaveta Kobalenko'.

Єлизавета КОВАЛЕНКО

(підпис)