

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS SUBTILLIS* ПО ОТНОШЕНИЮ К ГРИБАМ *MUCOR RAMOSISSIMUS*, *ASPERGILLUS FUMIGATUS*, *ASPERGILLUS NIGER*

***Зон Г.А., **Аранчий С.В.,**Кинаш О.В.**

* Сумской национальный аграрный университет,
г.Сумы, Украина,

** Полтавская государственная аграрная академия,
г.Полтава, Украина

Введение. На сегодняшний день во всем мире проводятся исследования, посвященные изучению методов обеззараживания, основанных на биологическом принципе борьбы за существование. Такие методы предполагают использование непатогенных пробиотических микроорганизмов, способных колонизировать деконтаминированные поверхности и препятствовать размножению других видов бактерий и грибов. *Bacillus subtilis* - типичный представитель группы пробиотических бактерий. Отсутствие патогенности у штаммов *Bacillus subtilis* послужило основанием для присвоения им Управлением по контролю качества продовольственных и лекарственных средств США (GRAS) статуса «generally regarded as safe» - безопасных микроорганизмов [3]. Доказано отсутствие каких-либо негативных последствий энтерального введения бактерий *Bacillus subtilis* и положительное воздействие данных пробиотических культур на иммунный статус животных [1]. В последнее время интерес к применению препаратов на основе живых культур *Bacillus subtilis* в ветеринарии значительно возрос. Их используют не только для обработки помещений, а также доильных установок, вымени коров [2,9], инкубационных яиц и для формирования нормального микробиоценоза у цыплят [10]. И.В.Савина и соавт. (2013) сообщают, что после обработки стационара для животных препаратом PIP AHS количество спор плесневых грибов в воздухе сократилось на 76% [9]. Однако, в литературе отсутствуют конкретизированные данные об антагонистической активности *Bacillus subtilis* по отношению к плесневым грибам – возбудителям оппортунистических микозов. В связи с этим целью нашей работы было определение антагонистических свойств *Bacillus subtilis* по отношению к грибам *Mucor ramosissimus*, *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger* – возбудителям мукормикоза и аспергиллеза птицы.

Материалы и методы исследований. Использовали агар Сабуро в качестве питательной среды. Предварительно исследовали характер роста *Bacillus spp.* на этой среде, поскольку она применяется для культивирования грибов. В качестве исследуемых организмов были

выбраны чистые культуры полевых штаммов грибов *Mucor ramosissimus*, *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus niger*. Готовили суспензию спор грибов с концентрацией 10^6 КОЕ/мл по стандартной методике [7]. В качестве культуры пробиотических микроорганизмов использовали препарат PIP Water Plus, который является собой споровую форму пробиотических бактерий рода *Bacillus* в концентрации 10^6 КОЕ/мл (Chrisal, Бельгия). При высеве на питательную среду полученная культура была идентифицирована как *Bacillus subtilis*. Исследование антагонистической активности бацилл по отношению к плесневым грибам проводили методом совместного культивирования на плотной питательной среде (метод капель в модификации Глушановой Н.А. и соавт.) [4,6] и методом отсроченного культивирования (метод штрихов) [5,8]. При исследовании с применением капельной методики выполняли одновременный посев *Bacillus subtilis* и тест-культур грибов на чашки Петри с агаром Сабуро с последующим их инкубированием в течение 48 часов при температуре 25-26°C. Задержку роста одной из исследуемых культур, либо рост одной культуры поверх другой следует расценивать как явление антагонизма, слияние колоний исследуемых микроорганизмов в зоне совместного культивирования следует расценивать как отсутствие антагонизма. При методе штрихов вначале проводили посев *Bacillus subtilis* и инкубировали на протяжении 24 часов при 37°C, затем подсеивали тест-культуры грибов и инкубировали при 25-26°C еще 48 часов, до появления характерного для данного вида гриба роста. Задержку роста культуры гриба более чем на 5 мм следует расценивать как признак антагонистической активности *Bacillus subtilis*. Полное слияние роста колоний, или усиление роста исследуемых грибов в зоне совместного культивирования интерпретируют как отсутствие антагонистических свойств *Bacillus subtilis* относительно культур грибов [4-6]. Каждый опыт повторяли в трехкратной последовательности. Данные, полученные при проведении эксперимента обрабатывали статистически с вычислением среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm m$) в программе Microsoft Excel, OS Windows XP. Обработка фотографий проводилась в программе Microsoft Office Picture Manager.

Результаты исследований.

При совместном культивировании не выявлено антагонистических свойств *Bacillus subtilis* по отношению к плесневым грибам. В то же время, установлено, что все тест-культуры грибов до некоторой степени подавляли рост пробиотических бактерий (рис.1)

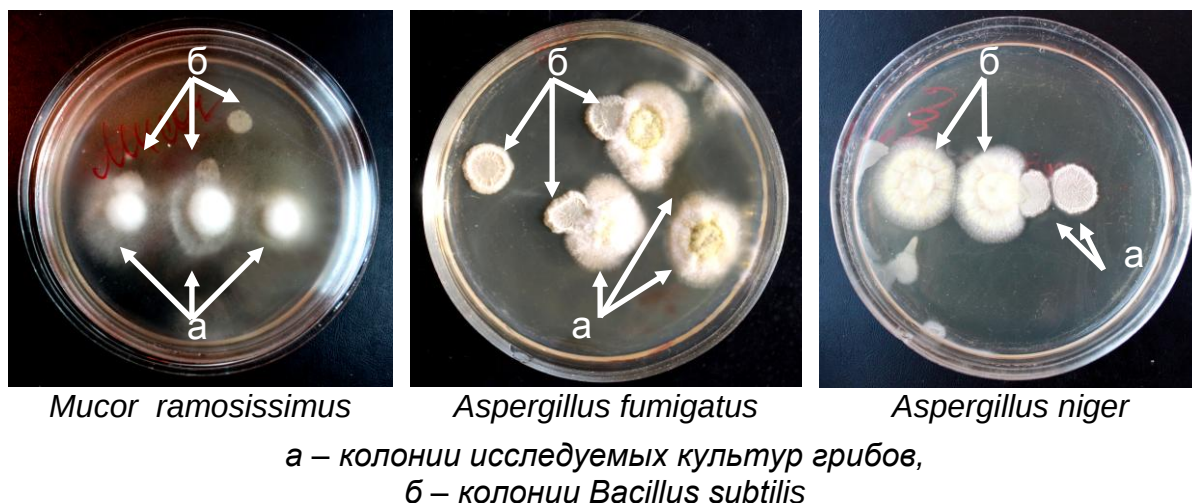


Рисунок 1 - **Определение антагонистической активности *Bacillus subtilis* по отношению к микромицетам (48 часов инкубации)**

Однако, по результатам исследований методом отсроченного культивирования были получены разноречивые результаты (рис.2): пробиотические бактерии проявили высокую антагонистическую активность в отношении гриба *Aspergillus niger*, и несколько меньшую – в отношении *Mucor ramosissimus* и *Aspergillus fumigatus* (табл.1).

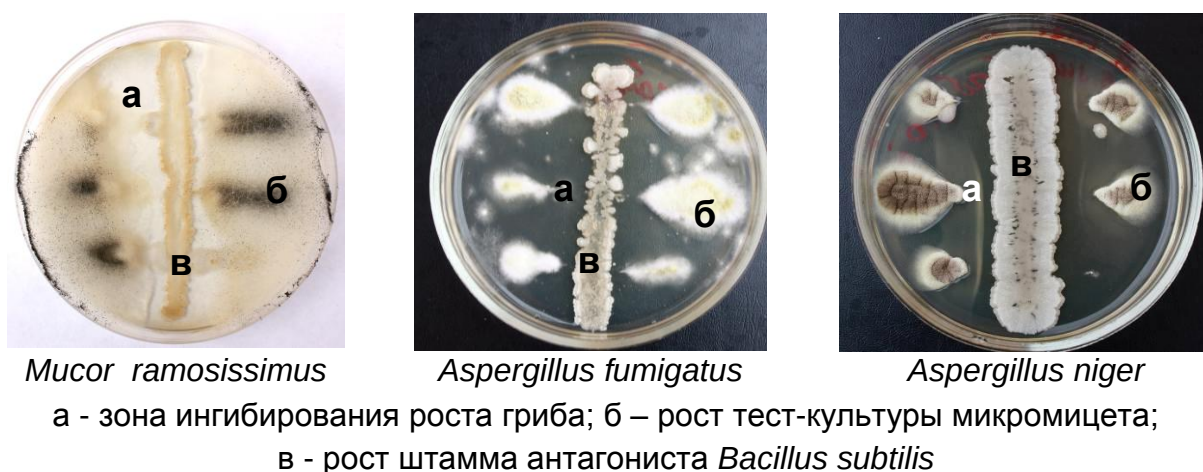


Рисунок 2 - **Определение антагонистической активности *Bacillus subtilis* методом перпендикулярных штрихов (48 часов совместной инкубации)**

Таблица 1 – **Результаты определения антагонистической активности *Bacillus subtilis* методом перпендикулярных штрихов (48 часов совместной инкубации)**

Величины зоны ингибирования (расстояние от колонии гриба до колонии <i>Bacillus subtilis</i>), мм ($M \pm m$, n=6)					
<i>Mucor ramosissimus</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
$M \pm m$	Lim*	$M \pm m$	Lim*	$M \pm m$	Lim*
5,7 $\pm$ 3,0	3-11	9,2 $\pm$ 1,6	11-7	5,8 $\pm$ 2,3	4-10

*Lim – значение нижнего и верхнего предела последовательности

Заключение. В опытах с использованием метода перпендикулярных штрихов зоны ингибирования роста тест-культур составляли: для *Mucor ramosissimus* – от 3 до 7 мм, для *Aspergillus niger* – от 11 до 7мм, для *Aspergillus fumigatus* – от 4 до 10 мм. При одновременном культивировании (метод капель) пробиотические бактерии *Bacillus subtilis* не проявляли антагонистических свойств в отношении тест-культур. Такие результаты можно объяснить антагонистической активностью не собственно самих бактерий, а продуктов их метаболизма – антибиотиков или ферментов, которые накапливались в питательной среде и служили причиной задержки роста грибов. Исследования свидетельствуют о том, что препараты, содержащие *Bacillus subtilis*, можно применить для обработки животноводческих помещений, инкубаториев, инкубационных яиц и т.д. с целью их деконтаминации от грибов родов *Aspergillus* и *Mucor*.

Литература. 1. Архипенко Н. В. Морфологическая характеристика организма беременных лабораторных животных при воздействии пробиотического штамма *bacillus subtilis* 3 : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук :: спец. 06.02.01 "диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и морфология животных" / Архипенко Н. В. – Саранск, 2012. – 21 с. 2. Барашкин, М. И. Эффективность комплексного применения средств на основе пробиотических бактерий в профилактике маститов и повышении качества молока / М. И. Барашкин // Ветеринария Кубани. - 2012. - № 6. - С. 24-25. 3. Гатауллин А. Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. биол. наук : спец. 03 00 07 "микробиология" / Гатауллин А. Г. – Москва, 2005. – 24 с. 4. Глушанова Н.А. Об антагонизме пробиотических лактобацилл / Н.А.Глушанова, А.И.Блинов, В.В.Бахаев // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2004. - №6. - С.37-39. 5. Изучение биологических свойств штаммов рода *Lactobacillus* [Электронный ресурс] / [А. Г. Точилина, И. В. Белова, И. В. Соловьева и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – Режим доступа к ресурсу: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21579>. 6. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл. / [Н. А. Глушанова, Н. Б. Вербицкая, Л. Н. Петров та ін.]. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – №6. – С. 138–142. 7. Методы экспериментальной микологии. Справочник / И.А.Дудка, С.П.Вассер, И.А.Элланская и др.; Под ред. В.И. Билая. – К.: Наук. думка, 1982. – 551 с. 8. Поиск перспективных штаммов бифидобактерий и лактобацилл для разработки новых биопрепаратов / Е.А.Постникова, Б. А. Ефимов, Н. Н. Володин, Л. И. Кафарская. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – №2. – С. 64–69. 9. Савина И. В. Влияние препарата PIP AHS на микрофлору животноводческих помещений / И. В. Савина, М. С. Сеитов. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – С. 95–98. 10. Степанова А. М. Применение пробиотика из штаммов бактерий *Bacillus subtilis* ТНП-3 и *Bacillus subtilis* ТНП-5 в птицеводстве : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. вет. наук : спец. 06.02.02. "ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология" / Степанова А. М. – Якутск, 2011. – 19 с.