

**ВПЛИВ ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *BACILLUS SUBTILIS*  
НА ШВИДКІСТЬ РОСТУ УГРУПОВАНЬ ВОДНИХ МІКРОМІЦЕТІВ  
ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ТВЕРДОМУ ПОЖИВНОМУ  
СЕРЕДОВИЩІ**

Рильський О.Ф., д.б.н., професор, Крупей К.С., аспірант, Амірілаєва А.О., студент

*Запорізький національний університет*

Стаття присвячена дослідження сезонної динаміки водних мікроміцетів та виявленню антагоністичних відносин між ними та бактерією *Bacillus subtilis*. У результаті досліджень у дніпровській та водогінній воді були виділені представники 8 родів мікроміцетів: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor*. Показано, що культура *B. subtilis* значно пригнічує розвиток мікроміцетів як на середовищі Сабуро, так і на Чапека.

*Ключові слова:* мікроміцети, *Bacillus subtilis*, рост.

Рыльский А.Ф., Крупей К.С., Амирилаева А.А. ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *BACILLUS SUBTILIS* НА СКОРОСТЬ РОСТА СООБЩЕСТВ ВОДНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ТВЕРДОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ / Запорожский национальный университет, Украина

Статья посвящена исследованию сезонной динамики водных микромицетов и выявлению антагонистических отношений между ними и бактерией *Bacillus subtilis*. В результате исследований в днепровской и водогонной воде были выделены представители 8 родов микромицетов: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor*. Показано, что культура *B. subtilis* значительно подавляет развитие микромицетов как на среде Сабуро, так и на Чапека.

*Ключевые слова:* микромицеты, *Bacillus subtilis*, рост.

Rylsky A.F., Krupey K.S., Amirilaeva A.A. EFFECT OF PROBIOTIC CULTURE *BACILLUS SUBTILIS* ON THE GROWTH OF AQUATIC FUNGI CULTIVATED ON SOLID MEDIA / Zaporizhzhya National University, Ukraine

This article is dedicated to the research of seasonal dynamics of aquatic fungi and identification of antagonistic relationships between the bacterium *Bacillus subtilis* and fungi. Such 8 genera's of aquatic fungi as *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor* were found out in the Dnipro and tap water. It is shown that the culture of *B. subtilis* significantly inhibits the development of aquatic fungi on both the mediums like Saburo and Capek.

*Key words:* aquatic fungi, *Bacillus subtilis*, growth.

## ВСТУП

Гриби належать до безхлорофільних гетеротрофних організмів, які живляться переважно осмотрофно і розмножуються, як правило, за допомогою спор. Відомо, що вони беруть активну участь у трансформації органічного субстрату у водоймищах і водотоках і роблять його доступнішим для бактерій. Проте їхня роль у водоймищах не обмежується деструкційними функціями: водні мікроміцети колонізують важко досяжні для інших організмів субстрати і нарощують при цьому значну біомасу, також вони самі включаються в трофічні ланцюги як джерело живлення ряду гідробіонтів. Активно продукуючи у водному середовищі біологічно активні речовини і ферменти, гриби можуть істотно змінювати його фізико-хімічні параметри та активність інших компонентів біоти [1]. На цих властивостях грибів запропоновані деякі способи очищення стічних вод, зокрема із застосуванням мікроміцетів [2]. Проте, з іншого боку, відомо, що гриби, які потрапляють у розподільчі водопровідні мережі, погіршують як органолептичні властивості води, так і виділяють у воду токсичні речовини – мікотоксини. Вони можуть призводити до виникнення хвороб, які за симптоматикою схожі на рак, туберкульоз, проказу. У відносно здорових людей мікроміцети здатні викликати алергічні реакції, а також легеневі захворювання різного ступеня тяжкості [3]. Незважаючи на небезпечно

та наявність мікроміцетів у питній воді, систематичні дослідження з їх виявлення та видалення в Україні не проводяться. На сьогодні вченими зроблений порівняльний аналіз типових методів знезаражування води (хлорування, озонування, ультразвукова обробка) від мікроміцетів, рекомендовані технологічні параметри очищення води від них, запропоновані нові конструкції та технологічні схеми очищення, розроблений метод виявлення мікроміцетів у воді [4, 5]. Але в цих роботах вчені не приділяли достатньо уваги дослідженням мікробіологічних методів очистки води від мікроміцетів. Йдеться про явище мікробного антагонізму – пригнічення однієї популяції іншою. Мікроорганізми-антагоністи виділяють антибіотики, бактеріоцини, жирні кислоти, які викликають загибелю інших видів мікроорганізмів або затримують їх розмноження. В останні роки спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*, як найбільш відомі представники екзогенної мікрофлори, привертають увагу дослідників [6]. По-перше, вони характеризуються найбільш вираженою антагоністичною активністю за відношенням до патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. По-друге, відомо, що на основі аеробних спороутворюючих бактерій можна отримувати штами із заданими властивостями, оскільки ці бактерії є досить добре вивченою системою для клонування [7].

*Bacillus subtilis* («сінна паличка») – це грампозитивна, спороутворювальна факультативна аеробна ґрунтована бактерія. Здатність різних штамів *B. subtilis* синтезувати біофунгіциди, ферменти, антибіотикоподібні речовини, полісахариди тощо відкрила для людства можливість їх широкого застосування [6]. Так, встановлена антагоністична активність аборигенних штамів *B. subtilis* до ґрунтових мікроміцетів-фітопатогенів, тому можна їх використовувати з метою підвищення родючості ґрунтів [7, 8].

Бактерії роду *Bacillus* також є перспективною групою мікроорганізмів для створення високоефективних пробіотиків. Вони здатні затримувати ріст сторонньої для шлунково-кишкового тракту мікрофлори [9, 10]. Отже, розробка мікробіологічних методів очистки води із застосуванням *B. subtilis* дозволить не тільки очищати воду від мікроміцетів, але й насичувати організм цією корисною пробіотичною культурою, шляхом споживання її з водою.

Таким чином, метою роботи було дослідити сезонну динаміку водних мікроміцетів, виділених у водогінній та дніпровській воді, та виявити їх антагоністичні відносини з пробіотичною культурою *B. subtilis*.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проби для дослідження відбирали з р. Дніпро (м. Запоріжжя, центральний пляж) та водогінної води (ЗНУ, III корпус).

Об'єктом дослідження були водні мікроміцети (виділені з вищезазначених джерел протягом осіннього, зимового та весняного періодів) та пробіотична культура *Bacillus subtilis*, антагоністичну активність якої ми визначали. Відбір проб постійно проводили при стійких погодних умовах, вимірюючи їх перед початком роботи (табл. 1).

Напередодні відбору проб посуд був простерилізований. Проби води відбирали в скляні колби Ерленмейера місткістю 750 см<sup>3</sup> із щільно закритими пробками, які були захищені та зафіковані ковпачками.

Перед початком посіву була визначена необхідна кількість посівного матеріалу (1 мл), ступінь його розведення: водогінна вода без розведення (основний розчин), дніпровська вода 1:10 та концентрація клітин *Bacillus subtilis* ( $0,3 \times 10^5$  на мл). При визначенні концентрації клітин *Bacillus subtilis* користувалися стандартами каламутності клітинних суспензій [11, 12].

Таблиця 1 – Умови відбору проб мікроміцетів у дніпровській та водогінній воді

Сезон	Місце відбору проб	Температура, °C	Водневий показник, pH
Осінь	Дніпровська вода	16	7,6
	Водогінна вода	18	7,5
Зима	Дніпровська вода	4	7,6
	Водогінна вода	10	7,5
Весна	Дніпровська вода	11	8,5
	Водогінна вода	16	8,2

Посіви проводили на тверді середовища Сабуро та Чапека глибинним методом. Період інкубації тривав 7-10 діб при температурі 27 °C, після чого підраховували кількість колоній грибів [13]. Для встановлення кількості мікроорганізмів у пробі число колоній, виявлених при підрахунку, помножили на ступінь розведення.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зменшення кількості водних грибів при культивуванні їх із бактерією *B. subtilis* демонструє рисунок 1. Ріст мікроміцетів спостерігається біля країв стінки чашки Петрі (рис. 1 г).



Рис. 1 – Ріст мікроміцетів без *B. subtilis* та при сумісному культивуванні з *B. subtilis*: а – дніпровська вода з розведенням 1:10 на середовищі Сабуро; б – дніпровська вода з

розведенням 1:10 на середовищі Чапека; в – водогінна вода на середовище Сабуро; г – водогінна вода на середовищі Чапека.

Примітка: ДАС – середовище Сабуро, ЧА – середовище Чапека.

На рисунках показано, що кількість водних мікроміцетів у дніпровській та водогінній воді при культивуванні їх із клітинною суспензією *B. subtilis* значно менша, порівняно з культивуванням водних грибів без *B. subtilis* як на середовищі Сабуро, так і на середовищі Чапека.

Результати досліджень сезонної динаміки водних мікроміцетів представлені в таблицях 2-4.

Таблиця 2 – Кількісна характеристика водних мікроміцетів в осінній період (кл/мл)

Дослідні зразки	Середовище Сабуро	Середовище Чапека
Водогінна вода (контроль) <sup>#</sup>	1,46 ± 0,322	3,47 ± 0,925
Водогінна вода (основний розчин) <sup>#</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	0,33 ± 0,187 <sup>**</sup>	0,47 ± 0,192 <sup>*</sup>
Дніпровська вода (контроль) <sup>##</sup>	26,01 ± 3,055	17,33 ± 1,817
Дніпровська вода <sup>##</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	9,31 ± 1,182 <sup>***</sup>	7,33 ± 1,817 <sup>**</sup>

Примітка тут та далі: <sup>#</sup> – вода без розведення; <sup>##</sup> – вода з розведенням 1:10; \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001.

Якісний склад мікроміцетів у водогінній та дніпровській воді за осінній період відрізняється найбільшою кількістю та був представлений родами *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor*. Різноманіття мікроміцетів у дніпровській воді можна пояснити тим, що відбір проб припав на дощовий період і призвів до збільшення їх чисельності. Із даних таблиці 1 видно, що кількість водних мікроміцетів зменшується при культивуванні їх з культурою *Bacillus subtilis* як на середовищі Сабуро, так і на Чапека. Так, у водогінній воді на середовищі Сабуро кількість мікроміцетів складала 22,5 %, а на середовищі Чапека вона була майже вдвічі меншою – 13,5 % (порівняно з контролем). У дніпровській воді їх кількість при сумісному культивуванні з «сінною паличкою» дорівнювала 35,7 % та 42,2 % на середовищі Сабуро та Чапека відповідно.

Таблиця 3 – Кількісна характеристика водних мікроміцетів в зимовий період (кл/мл)

Дослідні зразки	Середовище Сабуро	Середовище Чапека
Водогінна вода (контроль) <sup>#</sup>	1,01 ± 0,218	1,73 ± 0,441
Водогінна вода (основний розчин) <sup>#</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	0,13 ± 0,091 <sup>***</sup>	0,27 ± 0,112 <sup>**</sup>
Дніпровська вода (контроль) <sup>##</sup>	12,73 ± 1,182	8,67 ± 1,919
Дніпровська вода <sup>##</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	3,30 ± 1,26 <sup>***</sup>	2,67 ± 1,182 <sup>*</sup>

У зимовий період якісний склад мікроміцетів у водогінній та дніпровській воді був найменшим, у ній зустрічалися представники родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Candida*. Кількість водних мікроміцетів, виділених із водогінної та дніпровської води, була майже вдвічі менша, порівняно з осіннім періодом. Така невелика

кількість грибів, можливо, пов'язана з низькою температурою води на момент відбору проб (температура дніпровської води – 4 °C, водогінної – 10 °C). Результати свідчать також про те, що кількість мікроміцетів зменшується при сумісному культивуванні з культурою *B. subtilis*: у водогінній воді кількість мікроміцетів складала 12,8 % та 15,6 %, а у дніпровській – 26 % та 31% на середовищі Сабуро та Чапека відповідно.

Таблиця 4 – Кількісна характеристика водних мікроміцетів у весняний період (кл/мл)

Дослідні зразки	Середовище Сабуро	Середовище Чапека
Водогінна вода (контроль) <sup>#</sup>	1,13 ± 0,236	5,53 ± 0,584
Водогінна вода (основний розчин) <sup>#</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	0,26 ± 0,153 **	0,33 ± 0,126 ***
Дніпровська вода (контроль) <sup>##</sup>	19,32 ± 2,282	12,67 ± 1,182
Дніпровська вода <sup>##</sup> + <i>Bacillus subtilis</i>	6,71 ± 1,869 ***	5,33 ± 1,333 ***

Якісний склад мікроміцетів у водогінній та дніпровській воді у весняний період представлений видами родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor*. З даних таблиці 4 видно, що кількість мікроміцетів у водогінній воді у весняний період на середовищі Чапека в 3 рази більша, порівняно з зимовим періодом та у 1,5 рази більша, порівняно з осіннім сезоном. Також ми бачимо, що кількість мікроміцетів значно зменшується при культивуванні їх з клітинною суспензією *B. subtilis*. У водогінній воді на середовищі Сабуро їх кількість становила 23 %, а на середовище Чапека майже в 4 рази менша – 6 %. У дніпровській воді на середовищі Сабуро та Чапека було 34,7 % та 42 % мікроміцетів відповідно.

Кількісну відмінність мікроміцетів на середовищі Чапека та Сабуро можна пояснити тим, що на першому середовищі краще ростуть гриби, а на другому – актиноміцети. Слід також зазначити, що культура *B. subtilis* не впливає на розвиток багатьох видів актиноміцетів. Так, протягом всіх трьох сезонів при культивуванні «сінної палички» та водних грибів на середовищі Сабуро відмічається 19,5 % та 32 %, а на середовищі Чапека 11,7 % та 38,4 % мікроміцетів з водогінної та дніпровської води відповідно.

Отже, за результатами наших досліджень можна припустити, що пробіотична культура *B. subtilis* пригнічує ріст водних мікроміцетів та може бути рекомендована для очистки води від останніх. У подальшому планується продовження досліджень щодо впливу культури *B. subtilis* на ріст водних мікроміцетів та інших мікроорганізмів.

## ВИСНОВКИ

- Дослідження показали, що максимальна кількість мікроміцетів у водогінній воді спостерігається навесні ( $5,53 \pm 0,58$  кл/мл), а мінімальна – у зимовий період ( $1,01 \pm 0,218$ ); у дніпровській воді максимальна кількість водних грибів восени ( $26 \pm 3,055$  кл/мл), а мінімальна – взимку ( $8,67 \pm 1,19$ ).
- Визначення якісної характеристики мікроміцетів, у залежності від пори року, продемонстрували, що більша частина грибів відноситься до родів: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Candida*, *Mucor* та інших.

3. Встановлено, що кількість водних грибів зменшується при культивуванні їх з бактерією *Bacillus subtilis*. Таким чином, її можна рекомендувати для застосування у мікробіологічній очистці води від мікроміцетів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Дудка І. О. До екології та сезонної динаміки водних гіфоміцетів південної частини Київського Полісся / І. О. Дудка // Український ботанічний журнал. — 1964. — № 21. — С. 50-57.
2. Застосування мікроміцетів для очищення стічних вод за допомогою біоконвеєра / [Оліферчук В.П., Гурла У.Р., Сенюк А.І. та ін.] // Науковий вісник НЛТУ України. — 2008. — № 18.3. — С. 22-29.
3. Саприкіна М.М. Очищення води від мікроміцетів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук : спец. 05.17.21 «Технологія водоочищення» / М.М. Саприкіна. — Київ, 2010. — 16 с.
4. Мікроміцети в питній воді та шляхи її знезараження / [Гончарук В.В., Руденко А.В., Савлук О.С. та ін.] // Доповіді НАН України. — 2008. — № 11. — С. 187 – 191.
5. Патент № 85339 України, МПК<sup>6</sup> C 02 F 1/52. Способ очистки води від мікроскопічних грибів / Гончарук В.В., Савлук О. С., Саприкіна М.М.; заявник та власник Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського Національної академії наук України. — № 200714467; заявл. 21.12.2007; опубл. 10.01.2009, Бюл. № 1.
6. Копыльцов С.В. Сенная палочка – *Bacillus subtilis* / С.В. Копыльцов // БиоМир. – 2011. – № 2. – С. 6. – (Печатный орган первой биотехнологической компании «БИОТЕХАГРО»).
7. Грошева Е.В. Влияние аборигенных штаммов *Bacillus subtilis* на микробоценоз чернозема выщелоченного и продуктивность сахарной свеклы : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. с/х наук : спец. 06.01.09 «Растениеводство» / Е.В. Грошева. – Рамонь, 2009. – 20 с.
8. Курдиш І.К. Інтродукція мікроорганізмів у агроекосистеми / І.К. Курдиш. – К.: Наукова думка, 2010. – 255 с.
9. Борщ С.К. Диференційоване застосування пробіотиків для лікування кишкових інфекцій та синдрому дисбактеріозу кишечнику / С.К. Борщ // Сучасна гастроenterологія : Укр. наук.-практ. журн. – 2008. – № 2. – С. 21-26.
10. Похilenko В.Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В.Д. Похilenko, В.В. Перелыгин // Химическая и биологическая безопасность. — 2007. — № 2-3. — С. 20-41.
11. Антипчук А.Ф. Водна мікробіологія : опорний конспект лекцій / А.Ф. Антипчук. – К.: Університет «Україна», 2008. – 60 с.
12. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. – К.: Укрмедпатентінформ, 2006. – 5 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
13. Унифицированные методы исследования качества воды, СЭВ: Методы микробиологического анализа вод. – Ч. 1. – [Издание 2-е]. – М., 1975. – 138 с.