

УДК 579.64:579.852.11:632.952:631.463

## АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS*, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДЛЯ СТВОРЕННЯ КОНСЕРВАНТІВ ВОЛОГОГО ПЛЮЩЕНОГО ЗЕРНА КУКУРУДЗИ

Н. О. Кравченко, М. Г. Передерій

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: nat.probiotik@gmail.com

Досліджено антагоністичну активність штамів *Bacillus subtilis*, перспективних для створення консервантів вологого плющеного зерна кукурудзи. Досліджувані штами характеризуються антагоністичною активністю до патогенних та умовно-патогенних бактерій. Найчутливішими до штамів-антагоністів виявилися представники *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus*. За здатністю пригнічувати ріст патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів найкращі показники відзначено у штамів *B. subtilis* Вбу та В1.

Вивчено родовий склад мікофлори на вологому зерні плющеної кукурудзи. У 52 % випадків вона представлена *Penicillium* sp., решта припадає на роди *Fusarium* (13 %), *Rhizopus* (13 %), *Gliocladium* (11 %) та *Mucor* (11 %). Встановлено високу чутливість зазначених мікроміцетів до досліджуваних штамів *B. subtilis*. Найвищий рівень антифунгальної активності штамів-антагоністи виявляють до тест-культур мікроміцетів родів *Mucor*, *Rhizopus* та *Penicillium*.

Ключові слова: штами-антагоністи *Bacillus subtilis*, патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми, мікроміцети, антагоністична активність, антифунгальна активність, вологе зерно плющеної кукурудзи.

Консервування плющеного зерна кукурудзи, зібраного на ранніх стадіях стиглості при вологості 35–40 %, є одним із перспективних ресурсозберігаючих способів заготівлі корму для тварин [1; 2]. Принцип заготівлі консервованого плющеного зерна кукурудзи майже не відрізняється від заготівлі силосованої зеленої маси: вологе зерно плющиться, ущільнюється та зберігається в герметичних умовах для запобігання доступу кисню та розвитку небажаних процесів [2; 3]. Проте мікробіологічні процеси за консервування вологого зерна мають і деякі відмінності від подібних за консервування зеленої маси рослин. Зокрема, за консервування плющеного зерна (особливо низької вологості) анаеробні умови створюються значно пізніше (за 2–3 доби), ніж за силосування та сінажування, через це виникають сприятливі умови

для росту та розвитку мікроміцетів (плісеневих грибів та дріжджів), накопичення їх високотоксичних метаболітів (мікотоксинів). Крім того, бурхливе розмноження мікроміцетів у консервованому зерні кукурудзи може виникати за надходження кисню до сховищ після їх відкриття, коли порушується герметичність та в товщу субстрату починає надходити кисень, що призводить до аеробного псування консервованого зерна [4–6].

Одним із ефективних прийомів запобігання псуванню корму, у тому числі аеробному, є використання консервантів, зокрема біологічних, які забезпечують формування оптимального співвідношення органічних кислот, скорочення втрат поживних речовин, а також покращують аеробну стабільність зерна в процесі його збереження та згодову-

вання [7–9]. Тому при відборі штамів мікроорганізмів для розробки біоконсервантів вологого плющеного зерна важливо враховувати, окрім їх здатності до синтезу молочної кислоти, можливість інгібувати ріст і розвиток небажаних мікроорганізмів, у тому числі мікроміцетів. Перспективними щодо цього є представники *Bacillus subtilis*, які здатні проявляти високу антагоністичну та антифунгальну активність до широкого спектру патогенних і умовно-патогенних бактерій та мікроміцетів [10–12].

У зв'язку з вищезазначеним метою нашої роботи було дослідження антагоністичної та антифунгальної активності раніше селекціонованих нами штамів *B. subtilis*, перспективних для створення консервантів плющеного зерна кукурудзи.

**Матеріали та методи.** Об'єктами дослідження були штами *B. subtilis* В1, В3, В6у, 44-р, виділені зі шлунково-кишкового тракту сільськогосподарських тварин, та штам *B. subtilis* В32, виділений із консервованої зеленої маси рослин у лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук. Штами *B. subtilis* В3, 44-р, В1 та В6у депоновано у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Штам *B. subtilis* 44-р є основою пробіотичного препарату БПС-44 і в дослідях використовувався як позитивний контроль.

Як тест-культури для встановлення антагоністичної активності досліджуваних штамів *B. subtilis* використовували штами патогенних (ПМ), умовно-патогенних бактерій (УПМ) *Escherichia coli* 055 к 59 № 3912, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853, *Proteus mirabilis* № 3177, *Proteus vulgaris* № 13, *Salmonella typhimurium* № 89, *Staphylococcus aureus* № 906 з колекції лабораторії пробіотиків.

Як тест-культури для встановлення антифунгальної активності досліджуваних штамів *B. subtilis* використовували мікроміцети родів *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Mucor*, виділені з консервованого плющеного зерна кукурудзи співробітниками лабораторії пробіотиків ІСМАВ НААН та ідентифіковані доктором біологічних наук Є. П. Копиловим.

Вирощування штамів *B. subtilis*, тест-культур патогенних, умовно-патогенних бактерій та мікроміцетів здійснювали на стандартних живильних середовищах — м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), м'ясо-пептонному агарі (МПА), середовищі Чапека.

Антагоністичну та антифунгальну активності штамів *B. subtilis* досліджували методом відстрочених посівів (перпендикулярних штрихів) [13].

Для визначення антагоністичної активності штами-антагоністи ризику засівали на поверхню агару та через добу, після інкубації за температури 37 °С, перпендикулярно до нього на відстані не більше 1–2 мм рисками підсівали тест-культури ПМ та УПМ. Контролями росту тест-культур слугували їх паралельні посіви на чашки з тими ж середовищами, але без штамів-антагоністів.

Для визначення антифунгальної активності штамів *B. subtilis* у чашку Петрі з МПА штрихом наносили штам-антагоніст, після інкубації в термостаті за 37 °С упродовж 24–48 годин перпендикулярно до нього на відстані уколком вносили тест-культури мікроміцетів. Культури інкубували упродовж 10 діб за температури 28 °С. Контрольними варіантами слугували чисті культури мікроміцетів, висіяні окремо. Ступінь інгібування росту ПМ, УПМ та мікроміцетів розраховували за формулою Аббота:

$$I = \left( 1 - \left( \frac{A}{B} \right) \right) * 100,$$

де I — % інгібування;

A — ріст тест-культури у варіанті;

B — ріст тест-культури у контролі.

Отримані результати статистично обробляли з використанням пакета прикладних програм Microsoft Office.

**Результати та їх обговорення.** Відомо, що на поверхні зерна кукурудзи присутня різноманітна мікробіота, чисельність якої невелика, а видовий склад досить постійний. Більш ніж 90 % мікробіоти зерна складають гнильні мікроорганізми, трапляються мікрококи, молочнокислі бактерії, кишкова паличка та мікроміцети. Також на зерні можуть виявлятися випадкові мікроорганізми — патогенні для тварин та людини [14]. При зберіганні зерна з вологістю нижче критичної (13–14 %) бактерії та плісеневі гриби знаходяться у стані спокою. Умови заготівлі воло-

гого зерна плющеної кукурудзи без застосування консервантів сприяють росту та розвитку наявних у сировині мікроорганізмів, а накопичення бактерій *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. fluorescens*, представників роду *Clostridium* тощо призводить до гниття і зниження поживності корму [15; 16]. Застосування біоконсервантів, до складу яких входять штами бактерій-антагоністів, може бути запобіжником негативного впливу небажаних у процесі силосування мікроорганізмів.

Аналіз результатів щодо антагоністичної активності перспективних для створення консервантів штамів *B. subtilis* свідчить, що найвищий ступінь інгібування росту та розвитку спостерігається за впливу штамів-антагоністів на ріст і розвиток таких важливих у санітарному відношенні мікроорганізмів, як *E. coli* та *S. aureus* (табл. 1). За здатністю пригнічувати ріст *E. coli* серед штамів-антагоністів найкращими показниками характеризувався *B. subtilis* Вбу, за впливу якого ступінь інгібування росту тест-культури була вірогідно вищою — у 2,25 рази ( $p \leq 0,001$ ) — за відповідне значення позитивного контролю (штаму *B. subtilis* 44-р). Ступінь пригнічення росту *S. aureus* за впливу *B. subtilis* В1 та Вбу виявився вищим у 1,8 та 1,7 рази ( $p \leq 0,001$ ) за показник, отриманий при використанні *B. subtilis* 44-р.

Антагоністичну активність у досліджуваних штамів виявлено також до *S. typhimurium* із ступенем інгібування росту від 16 % до 44 % та до *P. vulgaris* із ступенем пригнічення росту у 80 % штамів від 12 % до

28 %. Найменш чутливими до штамів-антагоністів *B. subtilis* виявилися тест-культури *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*.

Не менш важливими для бактерій, перспективних для включення до складу біоконсервантів, є прояв антифунгальних властивостей.

Зазвичай чисельність мікроміцетів у зерні кукурудзи невелика (в 1 г міститься до 0,3 тис.), при цьому вони представлені видами родів *Penicillium*, *Aspergillus*, трапляються *Cephalosporium* та *Fusarium*. Їх активне розмноження, а водночас і негативний вплив на якість та безпечність корму, спостерігається за підвищення вологи та температури у сировині [14–16].

За результатами досліджень родового складу мікроміцетів у зерні плющеної кукурудзи перед консервуванням нами виявлено представників родів *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gliocladium* та *Mucor*. У переважній більшості (52 %) мікофлора представлена видами роду *Penicillium*. Роди *Fusarium* та *Rhizopus*, *Gliocladium* та *Mucor* у плющеному зерні представлені менш рясно (рис. 1).

Отже, плющення вологого зерна кукурудзи сприяє розвитку різноманітного видового складу мікроміцетів, що за його консервування без застосування консервантів може супроводжуватися втратами сухої речовини, зниженням якості, гниттям та накопиченням у зерні мікотоксинів.

З огляду на вищезазначене проведено дослідження антифунгальної активності досліджуваних штамів *B. subtilis* (табл. 2). Встановлено, що всі використані у досліді бакте-

Таблиця 1. Антагоністична активність штамів *B. subtilis*, перспективних для створення біоконсервантів

Штами <i>B. subtilis</i>	Ступінь інгібування, %					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
44-р (позитивний контроль)	32,0 ± 0,6	8,0 ± 1,1	12,0 ± 0,6	26,0 ± 1,1	44,0 ± 1,1	27,9 ± 1,1
В1	33,9 ± 0,9	8,0 ± 0,6	15,9 ± 0,9	27,9 ± 0,6	33,9 ± 0,9	60,0 ± 0,4*
Вбу	72,0 ± 0,2*	20,0 ± 0,6*	12,0 ± 1,1	12,0 ± 0,6	15,9 ± 0,6	48,0 ± 0,2*
В3	15,9 ± 1,1	8,0 ± 0,4	8,0 ± 0,4	8,0 ± 0,4	20,0 ± 0,9	44,0 ± 0,6*
В32	32,0 ± 0,4	8,0 ± 0,2	12,0 ± 0,6	15,9 ± 1,1	36,0 ± 0,9	39,9 ± 0,4*

Примітка: \* — різниця вірогідна в порівнянні зі штамом *B. subtilis* 44-р ( $p \leq 0,001$ ).

Таблиця 2. Антифунгальна активність штамів *B. subtilis*

Штами <i>B. subtilis</i>	Ступінь інгібування росту тест-грибів, %				
	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Mucor</i>
44-р (позитивний контроль)	85,6 ± 2,4	79,6 ± 5,8	86,6 ± 3,9	76,7 ± 5,2	94,6 ± 3,1
B1	93,1 ± 0,4*	84,1 ± 4,8	89,0 ± 4,2	90,5 ± 2,9	93,3 ± 5,0
B3	82,6 ± 1,1	55,0 ± 7,3	93,3 ± 1,4	84,7 ± 3,3	92,7 ± 0,7
B6y	89,5 ± 1,3	77,6 ± 4,7	85,5 ± 1,5	79,4 ± 3,5	95,3 ± 1,4
B32	85,7 ± 3,9	72,6 ± 5,9	95,0 ± 1,0	89,8 ± 2,4	85,8 ± 3,4

Примітка: \* — різниця вірогідна в порівнянні зі штамом *B. subtilis* 44-р ( $p \leq 0,05$ ).

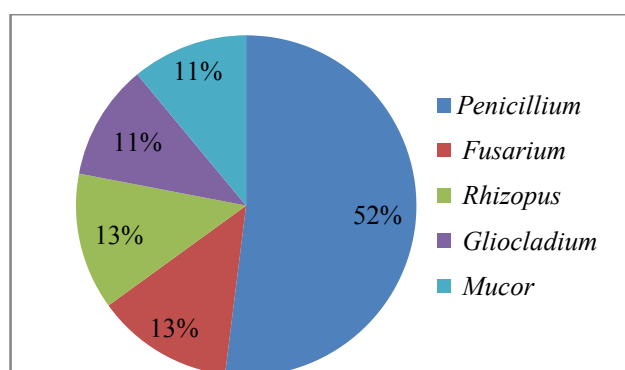


Рис. 1. Родовий склад мікроміцетів у вологому зерні плющеної кукурудзи перед консервуванням.

ріальні штами суттєво пригнічують ріст наявних у вологому зерні мікроміцетів. Ступінь інгібування їх росту коливається від 55 % за впливу *B. subtilis* B3 до 95,3 % за дії *B. subtilis* B6y.

Найвищий рівень антифунгальної активності штами-антагоністи виявляють до тест-культур мікроміцетів з родів *Mucor*, *Rhizopus* та *Penicillium*. Середні показники ступеня пригнічення досліджуваними штамми росту мікроміцетів, зокрема представників роду *Penicillium*, становить 87,3 %, що є важливим з точки зору частоти виділення цього гриба з вологого плющеного зерна кукурудзи. При порівняльному аналізі антифунгальних властивостей штамів-антагоністів з виробничим штамом *B. subtilis* 44-р відносно тест-культур мікроміцетів роду *Penicillium* встановлено вірогідно вищий показник пригнічення його росту за дії штаму B1.

Найменший антифунгальний вплив досліджувані штами *B. subtilis* виявили до тест-культур *Fusarium sp.*: ступінь інгібування їх росту становила від 55 ± 7,3 % (штам B3) до

81,1 ± 4,8 % (штам B1). Проте вірогідної різниці між показниками ступеня пригнічення росту тест-культур *Fusarium sp.* за впливу досліджуваних бактеріальних штамів-антагоністів та штаму *B. subtilis* 44-р не виявлено.

Отже, досліджувані штами *B. subtilis* характеризуються антагоністичною активністю до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Найчутливішими до антагоністів виявилися тест-культури *E. coli* та *S. aureus*.

За результатами аналізу видового складу мікроміцетів встановлено, що у 52 % зразків мікофлора вологого плющеного зерна кукурудзи представлена видами *Penicillium sp.*, решта припадає на роди *Fusarium* (13 %), *Rhizopus* (13 %), *Gliocladium* (11 %) та *Mucor* (11 %). Встановлено чутливість зазначених мікроміцетів до штамів *B. subtilis*. Найвищий рівень антифунгальної активності штами-антагоністи виявляють до тест-культур мікроміцетів з родів *Mucor*, *Rhizopus* та *Penicillium*.

Отримані результати обґрунтовують доцільність використання досліджуваних штамів *B. subtilis* у складі біоконсервантів для запобігання неконтрольованих мікробіологічних процесів у консервованому плющеному зерні кукурудзи.

1. Виробництво, зберігання і використання кормів / [М. Ф. Кулик, В. Ф. Петриченко, І. І. Ібатуллин та ін.]. — Вінниця : Нова книга, 2005. — 472 с.

2. Консервирование плющеного зерна — энергосберегающая технология / С. И. Голохвастова // Животноводство России. — 2000. — № 4. — С. 23–24.

3. Заготовка, хранение и использование плющеного зерна повышенной влажности // Беларус-

ское сельское хозяйство. — 2004. — № 8. — С. 21–24.

4. Pettersson K. Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality : doctoral thesis / K. Pettersson ; Swed. Univ. Agric. Sci., Dept. of Animal Nutrition & Management. — Uppsala, Sweden, 1988. — Report 179. — P. 75–121.

5. Beck Th. Ursachen der unterschiedlichen haltbarkeiten von gärfutter [The cause of the different stability of silages] / Th. Beck & F. Gross // Das wirtschaftseigene Futter. — 1964. — Vol. 10. — P. 298–312.

6. Jonsson A. The role of yeast and clostridia in silage deterioration : doctoral thesis / A. Jonsson // Swed. Univ. Agric. Sci., Dept. of Microbiology. — Uppsala, Sweden, 1989. — Report 42. — P. 80–131.

7. Сулова М. А. Влияние биологического препарата на микробиологические показатели и химический состав плющеного зерна кукурузы / М. А. Сулова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. — 2012. — № 34-1, Т. 2. — С. 38–40.

8. Muck R. E. A lactic acid bacteria strain to improve aerobics stability of silages / R. E. Muck // Research Summaries. — Madison : U. S. Dairy Forage Res. Center, 1996. — P. 42–43.

9. Driehuis F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability / F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra // J. Appl. Microbiol. — 1999. — Vol. 87. — P. 583–594.

10. Кравченко Н. О. Консервуюча здатність

*Bacillus subtilis* при заготівлі плющеного вологого зерна кукурудзи / Н. О. Кравченко, С. П. Чумаченко, М. Г. Передерій // С.-г. мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. — Чернігів : ІСМАВ НААН, 2017. — Вип. 25. — С. 57–62.

11. Победнов Ю. А. Эффективность применения бактерий вида *Bacillus subtilis* при силосовании и сенажировании трав / Ю. А. Победнов, А. А. Мамаев // Ветеринарная патология. — 2005. — № 1. — С. 90–96.

12. Консервування зернобобових кормових культур підвищеної вологості за використання бактеріального препарату БПС-Л / [Кравченко Н. О., Божок Л. В., Агеев В. О. та ін.] // Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — 2012. — Вип. 13, № 3–4. — С. 202–206.

13. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. — М. : Высш. школа, 1965. — 211 с.

14. Теппер Е. З. Практикум по микробиологии : учебное пособие для вузов // Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева ; под. ред. В. К. Шильниковой — М. : Дрофа, 2004. — 256 с.

15. Мюллер Г. Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения / Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г. Д. — М. : Пищевая промышленность, 1977. — 344 с.

16. Смирнова Т. А. Микробиология зерна и продуктов его переработки : учеб. пособие для вузов / Смирнова Т. А., Кострова Е. И. — М. : Агропромиздат, 1989. — 159 с.

## **АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ СПОСОБНОСТЬ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КОНСЕРВАНТОВ ВЛАЖНОГО ПЛЮЩЕНОГО ЗЕРНА КУКУРУЗЫ**

**Н. А. Кравченко, М. Г. Передерій**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Исследовано антагонистическую активность штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, перспективных для создания консервантов влажного зерна плющеной кукурузы. Исследованные штаммы характеризуются антагонистической активностью к патогенным и условно-патогенным бактериям. Наиболее чувствительными к штаммам-анта-*

## **ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* STRAINS, PERSPECTIVE COMPONENTS FOR CREATION OF ROLLED HIGH-MOISTURE CORN PRESERVATIVES**

**N. O. Kravchenko, M. H. Perederii**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*Antagonistic activity of *Bacillus subtilis* strains, perspective components for creation of rolled high-moisture corn preservatives was investigated. Investigated *B. subtilis* strains showed antagonistic activity against pathogenic and conditionally-pathogenic microorganisms. Test-cultures of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed the highest sensibility to the*

гонистам оказались представители *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. По способности угнетать рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов лучшие показатели отмечены у штаммов *B. subtilis* B6y и B1.

Изучено родовой состав микофлоры на влажном зерне плющеной кукурузы. В 52 % случаев она представлена *Penicillium* sp., остаток приходится на роды *Fusarium* (13 %), *Rhizopus* (13 %), *Gliocladium* (11 %) и *Mucor* (11 %). Установлено высокую чувствительность отмеченных микромицетов к исследуемым штаммам *B. subtilis*. Наиболее высокий уровень антифунгальной активности штаммы-антагонисты проявили к тест-культурам микромицетов родов *Mucor*, *Rhizopus* и *Penicillium*.

Ключевые слова: штаммы-антагонисты *Bacillus subtilis*, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, микромицеты, антагонистическая активность, антифунгальная активность, влажное зерно плющеной кукурузы.

antagonistic *B. subtilis* strains. *B. subtilis* strains B6y and B1 showed the best ability to inhibit the growth of pathogenic and conditionally-pathogenic microorganisms.

Flora genus composition on rolled high-moisture corn grain was studied. Flora of rolled high-moisture corn grain is presented by the genus *Penicillium* in 52 % of cases, a remainder consists of the genus species *Fusarium* (13 %), *Rhizopus* (13 %), *Gliocladium* (11 %), and *Mucor* (11 %). Above-mentioned micromycetes showed high sensibility towards investigated *B. subtilis* strains. Antagonistic *B. subtilis* strains showed the highest rate of antifungal activity against test-cultures of micromycetes of the genus species *Mucor*, *Rhizopus*, and *Penicillium*.

Key words: antagonistic *Bacillus subtilis* strains, pathogenic and conditionally-pathogenic microorganisms, micromycetes, antagonistic activity, antifungal activity, rolled high-moisture corn grain.

Отримано 12.09.2017