

Корисна модель належить до мікробіології, медицини та біотехнології, а саме стосується мікробних засобів для загоєння ран на основі комплексу екзометаболітів пробіотичних бактерій.

Аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* розглядають як перспективну групу мікроорганізмів для створення антимікробних препаратів. Особливо це актуально у зв'язку з швидким поширенням патогенних мікроорганізмів, резистентних до антибіотиків [1]. Штами бацил є компонентами пробіотичних препаратів для лікування різних патологічних станів людини та тварин, в тому числі інфекційних процесів, завдяки їх здатності до синтезу комплексу біологічно активних метаболітів (антибіотичних речовин, ферментів, антиоксидантних речовин, амінокислот, полісахаридів, вітамінів та інших) [2], [3].

Так, зокрема встановлено позитивний вплив пробіотичних бактерій роду *Bacillus* на процеси загоєння ран в ряді досліджень. Відомий ранозагоювальний біопрепарат, що містить живу мікробну масу штаму *Bacillus subtilis* 3H або штаму *Bacillus subtilis* 11B, або штаму *Bacillus* 12B і гелеву основу [4]. Бактиспорин (*B. subtilis* 3H), який спричиняє антибактеріальну дію, сприяє очищенню ран та осередків запалення від некротизованих тканин [5]. Відомий препарат Споробактерин на основі штаму *Bacillus subtilis* 534, рекомендований для лікування запальних процесів та ран різного генезу, профілактики гнійно-септичних ускладнень до та після хірургічних операцій [6]. Недоліком даних препаратів є їх монокомпонентний склад, що обмежує їх лікувально-профілактичну ефективність. Також у всіх випадках рани обробляють або суспензією живих клітин *Bacillus subtilis*, або мазями, що містять спори бацил.

Перспективним підходом до лікування ран є використання постбіотиків, які є цінними функціональними біоактивними речовинами, синтезованими пробіотичними штамми мікроорганізмів у процесі їхньої метаболічної активності [7].

Актуальним напрямком досліджень є використання наноматеріалів, зокрема, часток діоксиду церію, які здатні підвищувати біологічну активність мікроорганізмів [8]. Наночерій (нанооксид церію, CeO_2) має великий потенціал у біомедичних дослідженнях завдяки своїм унікальним фізико-хімічним та біологічним властивостям.

Відомо про дослідження метаболічних профілів пробіотичних штамів мікроорганізмів: родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* та *Bacillus* за присутності наночасток CeO_2 у культуральному середовищі [9]. Однак завданням зазначеного дослідження не було створення композицій штамів мікроорганізмів із цільовим призначенням.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб одержання композиції пробіотичних штамів *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* з антиоксидантною активністю, що була заявлена у патенті на корисну модель № 140654 від 10.03.2020 р. Недоліком способу одержання зазначеної композиції є те, що останній не передбачав виділення метаболітів із культурального середовища для їх зовнішнього застосування для загоєння ранових поверхонь. Крім цього, важливим є збільшення ростової та метаболічної активностей штамів під впливом наночерію.

В основу корисної моделі поставлено задачу розроблення способу отримання композиції на основі метаболітів пробіотичних бактерій роду *Bacillus* із удосконаленням способу культивування бактерій для підвищення їх ростової та метаболічної активності, визначення оптимальних умов для отримання екзометаболітів із культурального середовища для забезпечення лікувальної, антимікробної, антиоксидантної дії композиції.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання композиції для загоєння ран на основі метаболітів пробіотичних штамів бактерій, який характеризується тим, що штамми бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 і *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 роздільно культивують на синтетичному середовищі із додаванням нано- CeO_2 у концентрації 0,01 мМ, після чого культуральну рідину кожного штаму центрифугують, відфільтровують та змішують у співвідношенні 1:1.

Штами культур *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 і *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 культивують окремо на синтетичному середовищі з наночерієм (нано- CeO_2). Культуральну рідину (КР) пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* після вирощування на качалках звільняють від клітин шляхом центрифугування та фільтрування. Безклітинні культуральні середовища змішують у співвідношенні 1:1 для отримання ранозагоювальної пробіотичної композиції супернатантів штамів бацил з підвищеними антимікробною, антиоксидантною та лікувальною активностями.

Застосовані для здійснення способу пробіотичні штамми роду *Bacillus*, взаємно доповнюють один одного за спектром біологічної активності та продукують комплекс корисних метаболітів (антибіотичні та антиоксидантні сполуки, протеолітичні ферменти, полісахариди). Штами бактерій синтезують антимікробні речовини, які пригнічують широкий спектр патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів; фенольні сполуки з високою антиоксидантною активністю, що сприяють загоєнню ран та регенерації тканин; їх протеолітичні ферменти із тромболітичним ефектом попереджують утворення рубців та некротичний лізис тканин, тому прискорюють регенерацію тканин; екзополісахариди чинять антимікробний, антиоксидантний, антибіоплівковий, імуномодулюючий

вплив.

Штами бактерій *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 і IMB B-7143 вирощують на синтетичному середовищі наступного складу (г/л): глюкоза - 15,2, цитрат натрію - 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - 4,75, KH_2PO_4 - 9,63, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,18, pH=6,4-7,0. Культури вирощують в колбах Ерленмейера (V=750 мл) із 50 мл середовища в періодичних умовах на качалці (n=220 об./хв) при температурі 37 °C впродовж 24-48 год. Інокулят готують із 24-годинних бактеріальних клітин після росту на МПА по стандарту щільності 5 од. 5 % інокуляту додають до середовища культивування (2,5 мл на 50 мл поживного середовища).

Використовують стабілізований цитратом водний золь CeO_2 (0,1 М, 3-4 нм розмір часток, співвідношення стабілізатора до нано- CeO_2 як 1:1) [10].

Концентрацію стокового золю нано- CeO_2 зменшують в 10-1000 разів у стерильному фізіологічному розчині з наступним додаванням отриманих аліквот до середовища для вирощування мікроорганізмів у співвідношенні 1:100 (V : V).

Кількість життєздатних клітин (КУО/мл або титр) визначають шляхом серійних десятикратних розведень у фізіологічному розчині та висівають на МПА. Нано- CeO_2 додають до поживного середовища в оптимальній кінцевій концентрації 0,01 мМ.

Після вирощування на качалці культуральні рідини (КР) пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* звільняють від клітин шляхом центрифугування на центрифугі ОПН-8 - при 5000 g 15 хв. Звільнені від клітин супернатанти пропускають через шприцеві фільтри (PTFE, гідрофільні, d=13 мм, розмір пор мембрани - 0,22 мкм). Відфільтроване культуральне середовище кожного штаму об'єднують у співвідношенні 1:1.

Оптимальна концентрація нано- CeO_2 в поживному середовищі становила 0,01 мМ (табл. 1).

Таблица 1

Ростова активність штамів бактерій *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 та *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 за їх культивування з різними концентраціями нано- CeO_2

Варіанти дослідів	Чисельність клітин, КУО/мл	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> IMB B-7142	<i>B. amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> IMB B-7143
*Контроль	$(2,65 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(3,29 \pm 0,3) \cdot 10^8$
+ 1 мМ нано- CeO_2	$(9,67 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(1,37 \pm 0,2) \cdot 10^7$
+ 0,1 мМ нано- CeO_2	$(2,03 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(1,76 \pm 0,1) \cdot 10^8$
+ 0,01 мМ нано- CeO_2	$(3,52 \pm 0,1) \cdot 10^8$	$(3,88 \pm 0,3) \cdot 10^8$

Примітка:

початкова концентрація клітин *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 становила $(5,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$ КУО/мл,

початкова концентрація клітин *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 становила $(1,29 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КУО/мл;

*контроль - середовище без нано- CeO_2 .

Для підтвердження ефективності запропонованої композиції проводять дослідження антимікробної, антиоксидантної та лікувальної активностей супернатантів культур пробіотичних штамів, отриманих за їх культивування з наноцерієм у концентрації 0,01 мМ. Наведені нижче приклади призначені для ілюстрації та підтвердження ефективності запропонованої корисної моделі.

Приклад 1. Антимікробна активність

Культивування штамів IMB B-7142, IMB B-7143 на живильному середовищі з нано- CeO_2 впродовж 24-48 год сприяло підвищенню продукції ними метаболітів з антимікробною активністю щодо умовно патогенних тест-культур: грамнегативних (*P. vulgaris*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), грампозитивних (*S. aureus*) та дріжджоподібних грибків (*C. albicans*)

Безклітинні супернатанти штамів IMB B-7142, IMB B-7143, отримані після 24-вирощування бактерій з нано- CeO_2 , активно інгібують ріст клітин умовно-патогенних тест-культур, окрім *P. aeruginosa* ATCC 27959 (табл. 2). Ця активність була вищою, ніж та, що була виявлена у даних штамів без додавання нано- CeO_2 . Після 48 год культивування бактерій з нано- CeO_2 спостерігали ще вищий рівень антимікробної активності супернатанту до всіх досліджуваних тест-культур, в тому числі до *P. aeruginosa* ATCC 27959, яка була відсутня у 24-годинних культур.

Таблица 2

Антимікробна активність безклітинних супернатантів штамів *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 і *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 щодо умовно патогенних мікроорганізмів

Умовно-патогенні штами	Діаметр зони інгібування тест-культур, мм			
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> IMB B-7142		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> IMB B-7143	
	Контроль	+ нано-CeO ₂	Контроль	+ нано-CeO ₂
	24 год			
<i>P. vulgaris</i> 72	12,7±0,9	14,0±1,3	11,7±0,6	15,5±0,9**
<i>E. coli</i> 028	15,1±1,2	17,5±0,6*	14,1±0,9	16,3±0,5*
<i>S. aureus</i> 209	11,8±0,7	19,5±0,3**	11,8±0,3	12,5±0,6
<i>C. albicans</i> 690	11,7±0,5	16,5±1,1**	12,5±0,5	14,0±1,4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27959	-	-	-	-
	4S		год	
<i>P. vulgaris</i> 72	14,5±2,1	22,0±2,6**	13,1±2,4	17,0±1,8
<i>E. coli</i> 028	17,0±0,5	23,0±0,1**	12,5±0,6	15,0±1,1*
<i>S. aureus</i> 209	15,8±0,8	25,0±4,4**	18,3±0,9	21,5±0,9*
<i>C. albicans</i> 690	13,2±0,6	21,0±4,1**	11,6±0,7	19,4±0,7**
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27959	11,3±0,3	13,2±0,8*	11,8±0,6	14,3±0,4*

Примітки: "-" - зона інгібування відсутня; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$. Контроль - безклітинний супернатант, який отримували після культивування штаму бактерій в поживному середовищі без додавання нано-CeO₂.

До переваг композиції, що одержують за способом слід віднести її антифунгальну активність щодо патогенних дріжджових грибів *C. albicans*.

Приклад 2. Антиоксидантна активність

Встановлено, що за культивування пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 та IMB B-7143 з 0,01 мМ нано-CeO₂ впродовж 24 та 48 год суттєво зросла здатність їх безклітинних супернатантів деактивувати DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил радикал), гідроксильний радикал та радикал оксиду азоту, порівняно з контрольними зразками зображеними на фіг. 1, де представлений антиоксидантний потенціал безклітинного супернатанту пробіотичного штаму *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 за його культивування впродовж 24 (А) і 48 (В) год. в присутності нано-CeO₂ (0,01 мМ).

Примітки.

- Варіанти: 1. Антирадикальна активність до DPPH (%);
 2. Активність перехоплення супероксидного аніон-радикала (%);
 3. Активність перехоплення радикала оксиду азоту (%);
 4. Активність перехоплення гідроксильного радикала (%).

На Фіг. 2 представлений антиоксидантний потенціал безклітинного супернатанту пробіотичного штаму *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7143 за його культивування впродовж 24 (А) і 48 (В) год в присутності нано-CeO₂ (0,01 мМ).

Примітки.

- Варіанти: 1. Антирадикальна активність до DPPH (%);
 2. Активність перехоплення супероксидного аніон-радикала (%);
 3. Активність перехоплення радикала оксиду азоту (%);
 4. Активність перехоплення гідроксильного радикала (%).

Показано, що за вирощування пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 та IMB B-7143 впродовж 24 та 48 год присутності нано-CeO₂ їх безклітинні супернатанти характеризувалися високою здатністю до інактивації гідроксильного радикала - більш, ніж на 80 та 90 % порівняно з контрольними зразками (фіг. 1; фіг. 2).

Виявлено, що за культивування пробіотичного штаму IMB B-7142 з нано-CeO₂ активність перехоплення супероксидного аніон-радикала (O₂^{•-}) для його безклітинного супернатанта підвищилась лише за 24 год культивування і становила 54,2 %, тоді як за 48 год культивування - знизилась до 37,8 % (фіг. 1). Безклітинний супернатант штаму IMB B-7143 характеризувався високими показниками даної антирадикальної активності незалежно від часу культивування (фіг. 2).

Таким чином, спосіб, за якого культивують пробіотичні штами *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* IMB B-7142 та IMB B-7143 в присутності нано-CeO₂ (0,01 мМ) сприяє підвищенню продукції даними бактеріями метаболітів з антимікробною та антиоксидантною активностями.

Приклад 3. Лікувальна ефективність

Ефективність композиції, одержаної за запропонованим способом, перевірена у модельних дослідах на кролях породи Шиншила при лікуванні гнійної рани, інфікованої суспензією штамів *S. aureus* B-4001 ATCC 6538A, *K. pneumoniae*-R у дозі 100 мкл (1×10^8 кл/мл).

Щоденно проводили спостереження до повного закриття рани на 24 добу досліду. В ці строки реєстрували стан рани і вимірювали площу рани в см² та відсоток загоювання площі ранової поверхні (%) (табл. 3, 4).

Лікування ран починали одразу, як спостерігали ознаки інфікування та нагноєння.

Виявлено прискорення загоювання інфікованої рани кроля і зменшення площі ранової поверхні.

Таблиця 3

Площі ранових поверхонь у кроля за умов гнійної рани шкіри

Термін спостереження, доба	Площа ранової поверхні за умов норми та обробки ран препаратами, см ²			
	Ушкодження шкіри без лікування	Ушкодження шкіри + супернатант	Ушкодження шкіри + інфікування <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i>	Ушкодження шкіри + інфікування <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + супернатант
1	2,27	2,27	2,27	2,27
2	2,13	1,91	2,14	2,0
4	2,0	1,77	2,1	1,78
5	1,77	1,54	1,88	1,57
6	1,65	1,32	1,77	1,38
9	1,32	1,13	1,65	0,94
14	1,13	0,94	1,32	0,5
16	0,94	0,5	1,13	0,39
18	0,5	0,39	0,94	0,2
20	0,28	0,2	0,5	0,13
22	0,13	0	0,39	0
24	0	0	0,13	0

Таблиця 4

Динаміка загоювання площ ранових поверхонь у кроля за умов гнійної рани шкіри

Термін спостереження, доба після початку лікування	Відсоток загоювання площі ранової поверхні за умов норми та обробки ран препаратом пробіотичних штамів, %		
	Ушкодження шкіри без лікування	Ушкодження шкіри + інфікування <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i>	Ушкодження шкіри + інфікування <i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i> + супернатант
5	22,03	17,18	32,16
6	27,31	22,03	41,85
9	41,85	27,31	58,60
14	50,22	41,85	77,97
16	58,60	50,22	82,82
18	77,97	58,60	91,19
22	94,27	77,97	100
24	100	94,27	100

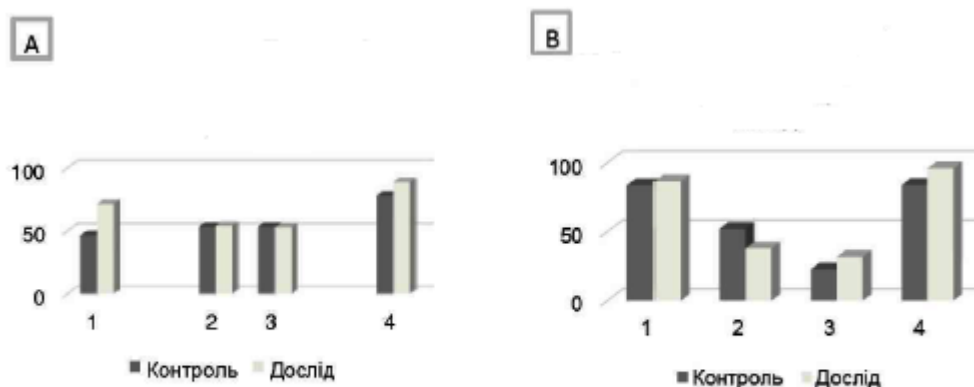
Регенеративний ефект композиції враховують за швидкістю загоювання рани і утворення рубця. Рани, не інфіковані, без лікування, гоїлись протягом 24 діб, а гнійні і ліковані - протягом 18 діб (Табл. 4).

Таким чином, отримані результати на моделі інфікованої гнійної рани у кролів свідчать про виражену ранозагоювальну дію композиції, спричинену її протизапальними й антимікробними властивостями.

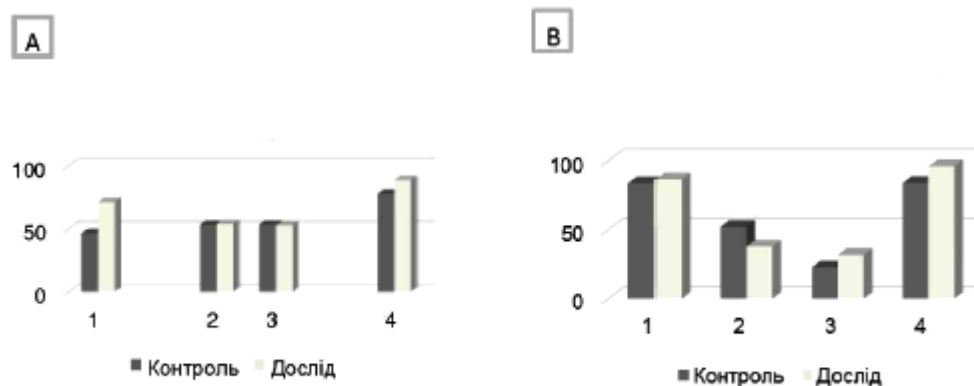
Спосіб одержання композиції забезпечив збільшення виходу клітинної біомаси, комплексу корисних екзометаболітів у процесі культивування штамів бацил, що обумовило її лікувальну дію: пригнічення розвитку патогенів у рані, покращення відновлення уражених тканин, прискорення їх загоєння, що свідчить про ефективність запропонованого способу.

Джерела інформації:

1. Imperial, I., & Ibane, J. A. (2016). Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. *Front. Microbiol*, 7, 1983. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01983>
2. Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol*, 8, 1490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
3. Bahaddad, S. A., Almalki, M. H. K., Alghamdi, O. A., Sohrab, S. S., Yasir, M., Azhar, E. I., & Chouayekh, H. (2023). *Bacillus* Species as Direct-Fed Microbial Antibiotic Alternatives for Monogastric Production. *Probiotics Antimicro. Prot*, 15, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09909-5>
4. Лукманова К.А., Зайнутдинова Ф.Н., Аюпова Г.В., Салихова Н.Х., Кузнецова Т.Н., Гиматдинов Р.И., Туйгунов М.М., Пат. RU2322996C2, Ранозаживляющий биопрепарат в виде геля, 2008.
5. Михайлова Н.А., Кузнецова Т.Н., Кунягина О.В., Пат. RU2130316C1, Лечебно-профилактический биопрепарат "бактиспорин", 1999.
6. Никитенко М.В., Никитенко В.И., Пат. RU2217154C2, Препарат споробактерин жидкий, 2003.
7. Kumar, A., Green, K. M., & Rawat, M. (2024). A Comprehensive Overview of Postbiotics with a Special Focus on Discovery Techniques and Clinical Applications. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(18), 2937. <https://doi.org/10.3390/foods13182937>
8. Л.П. Бабенко, Л.А. Данкевич, Н.М. Жолобак та інш. (2014). Вплив наночастинок діоксиду церію на різні фізіологічні групи мікроорганізмів. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.*, 60(3):45-51.
9. Kharchuk M., Kharkhota M., Vasyliuk O., Babenko L. (2022). Metabolism of lactobacillus, bifidobacterium and bacillus probiotic strains in the presence of CeO2 nanoparticles in the cultivation medium https://imv.org.ua/wp-content/uploads/2022/12/Kharchuk_2022.pdf
10. O. S. Ivanova, T. O. Shekunovae, V. K. Ivanov et.al. (2011). One-Stage Synthesis of Ceria Colloid Solutions for Biomedical Use. *Doklady Chemistry*, Vol. 437, Part 2, pp. 103-106.



Фіг. 1



Фіг. 2