

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Засновано у липні 2006 року

Виходить 4 рази на рік

№ 2(26)
2014

Одеса
ОНУ
2014

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р.А. Волков (Чернівці, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), С.П. Гудзь (Львів, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Ю.П. Зайцев (Одеса, Україна), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), О.А. Кіпріанова (Київ, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Чикаго, США), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немятловський (Варшава, Польща), В.П. Патица (Київ, Україна), Петров С.А. (Одеса, Україна), В.С. Підгорський (Київ, Україна), В.К. Позур (Київ, Україна), В.П. Поліщук (Київ, Україна), А.А. Сибірний (Львів, Україна), Ю.М. Сиволап (Одеса, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), І.А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф.І. Товкач (Київ, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова
Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05 /2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України

**Журнал індексується/реферується в Index Copernicus,
Джерело, Україніка наукова.**

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2014

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P.I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), S.P. Gudz (Lviv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), O. A. Kiprianova (Kyiv, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I.P. Metelitsyna (Chicago, USA), G. G. Minicheva (Odesa, Ukraine), M. Niemialtowsky (Warsaw, Poland), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S.A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V. P. Polishuk (Kyiv, Ukraine), V. K. Pozur (Kyiv, Ukraine), M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), Yu. M. Sivolap (Odesa, Ukraine), I. A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R. A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine), Yu. P. Zaytsev (Odesa, Ukraine)

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.
Registration certificate: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

**The journal was included to the list of Ukrainian scientific editions by the
Presidium of High Attestation Commission (№ 1-05 /2 from 27.05.2009).**

**MBT Journal is indexed in Index Copernicus database and is abstracted in
Ukrainian abstract journals "Source" (Dzherelo), and Bibliographic Database
"Ukrainika scientific" (Ukrainika Naukova)**

Publishing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: L.B. Kotlyarova, I.V. Raiko
A d d r e s s:
Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
[http: //mbt.onu.edu.ua](http://mbt.onu.edu.ua)

© Odesa National Mechnykov
University, 2014

З М І С Т

Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І

С.Л. Голембіовська, Т.В. Дворник, Л.М. Янченко, Б.П. Мацелюх ПРОДУКТИВНІСТЬ МУТАНТНОГО ШТАМУ <i>STREPTOMYCES</i> <i>GLOBISPORUS</i> 1912-4 LCP HP7 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ .	6
Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова БІОСИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ONU 301 ЗА ПРИСУТНОСТІ ЕКЗОГЕННОГО СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ	15
О.В. Мацелюх СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ СЕРИНОВОЇ ЛУЖНОЇ ПЕПТИДАЗИ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ІМВ В-7324.....	24
К.С. Огірчук, Н.К. Коваленко, О.А. Полтавська ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>ACIDOPHILUS</i> 55 В СЕРЕДОВИЩІ З СЕЛЕНІТОМ НАТРІЮ.....	34
О.В. Басюл, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ – ПРЕДСТАВНИКІВ РЕЗИДЕНТНОЇ МІКРОБІОТИ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ	45
І.В. Кушкевич АКТИВНІСТЬ ТА КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АДЕНОЗИН-5'- ФОСФОСУЛЬФАТРЕДУКТАЗИ КИШКОВИХ СУЛЬФАТВІДНОВ- ЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ.....	54
С.Л. Міресь, Н.С. Бобрешова, В.О. Кучеров, К.П. Буга, В.О. Іваниця МОДИФІКАЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ <i>AURICULARIA AURICULA-JUDAE</i> ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ	64
А.В. Путніков, М.П. Рудик, В.В. Позур, Т.М. Фурзікова, А.М. Остапчук, Г.М. Толстанова, Л.М. Сківка ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР АЦИДОФІЛЬНИЙ» НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ ЩУРІВ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ АНТИБІОТИКА ЦЕФТРИАКСОНУ	74
О.М. Шульга, М.В. Пристай, І.В. Карпенко, Н.С. Щеглова, Р.І. Вільданова ВПЛИВ АЛЮМОКАЛІЄВИХ ГАЛУНІВ НА СИНТЕЗ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ СПОЛУК.....	85
О.К. Фролов, Р.О. Литвиненко, О.Л. Ребець, І.С. Юрчук ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ <i>ESCHERICHIA COLI</i> 3912/41	94
ІХ ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ».....	101
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	103

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

S.L. Golembiovska, T.V. Dvornyk, L.M. Yanchenko, B.P. Matseliukh THE PRODUCTIVITY OF MUTANT STRAIN STREPTOMYCES GLOBISPORUS 1912-4LCPHP7 IN THE DIFFERENT CONDITIONS	6
Muchlis Abedalabas, M.B. Galkin, T.O. Filipova RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS IN <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ONU 301 IN THE PRESENCE OF EXOGENOUS SIGNALING QUINOLONE	15
O.V. Matseliukh SUBSTRATE SPECIFICITY OF <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> IMB B-7324 SERINE ALKALINE PEPTIDASE	24
K.S. Ogirchuk, N.K. Kovalenko, O.A. Poltavska OPTIMIZATION OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS 55 CULTIVATION IN A MEDIUM WITH SODIUM SELENITE	34
O.V. Basiul, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLI – OYSTER MUSHROOM RESIDENTIAL MICROBIOTA REPRESENTATIVES	45
I.V. Kushkevych ACTIVITY AND KINETIC PROPERTIES OF ADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE IN THE INTESTINAL SULFATE- REDUCING BACTERIA	54
S. Miros, N. Bobreshova, V. Kucherov, V. Ivanytsia MODIFICATION VARIABILITY OF <i>AURICULARIA AURICULA-JUDAE</i> , CULTURED ON MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITIONS.....	64
A.V. Putnikov, M.P. Rudyk, V.V. Pozur, T.M. Furzikova, A.M. Ostapchuk, G.M. Tolstanova, L.M. Skivka EFFECT OF MULTIPROBIOTIC «SYMBITER ACIDOPHILIC» USED AGAINST THE BACKGROUND OF THE COURSE OF INJECTIONS OF CEFTRIAZONE ANTIBIOTIC ON PERITONEAL MACROPHAGE FUNCTIONAL ACTIVITY IN RAT	74
A. Shulga, M. Prystai, I. Karpenko, N. Shcheglova, R. Vildanova INFLUENCE OF POTASSIUM ALUM ON THE SYNTHESIS OF MICROBIAL SURFACE-ACTIVE COMPOUNDS.....	85
O.K. Frolov, R.O. Litvinenko, O.L. Rebets, I.S. Yurchuk INFLUENCE OF MEDICAL LEECH'S EXOGENIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> 3912/41	94
IX SUMMER SCHOOL "MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY"	101
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	103

UDC 579.017.8

S.L. Golembiovska, T.V. Dvornyk, L.M. Yanchenko, B.P. Matseliukh

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny str.,
Kyiv, Ukraine, e-mail: golembiovska@ukr.net

THE PRODUCTIVITY OF MUTANT STRAIN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-4LCPHP7 IN THE DIFFERENT CONDITIONS

Aim. To determine the cause of decrease of carotenoid synthesis of lycopene in liquid medium from 4.2 to 2.8 mg/g of dry biomass in strains of *Streptomyces globisporus* 1912-4Lcp Hp7 and to select medium components and optimal conditions that contribute to the stabilization of the process. **Methods.** The selection of the producer was carried out to the feature of early synthesis of lycopene. Selected culture was cultivated in different liquid conditions. The biomass was determined gravimetrically, the amount of lycopene – with spectrophotometric method. **Results.** The reason for the decreased activity of the producer of lycopene *S. globisporus* 1912-4Lcp Hp7 of liquid cultivation was culture dissociation with formation of uncolor variants, frequency of 1×10^{-3} that observed after sieving suspension mycelium on agar medium. As it turned out, their accumulation was caused by the adding of corn flour into the cultivation medium, which, combined with oatmeal is used to nowadays, because it was this source of carbon and energy that contributed to the accumulation of biomass producer. The conditions for the cultivation of producer were defined: pH 7,0, 28°C, V_{inc} 10 ml, V_{med} 100 ml and concentration of salts: $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1%, $(NH_4)_2MoO_4$ – 0,05%, which stabilized the process of biosynthesis of lycopene in the liquid conditions. It is shown that lycopene biosynthesis also contributes to using sodium casein and temperature of 37 °C and $KMnO_4$, which is used for selection of the culture. **Conclusions.** It was found the reason for the decrease of lycopene biosynthesis in strains *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 and defined medium, optimal conditions and salt, which stabilized the process of biosynthesis of lycopene in liquid cultivation conditions.

Key words: streptomyces, strain producer, biosynthesis of lycopene.

Lycopene (ψ -carotene, $C_{40}H_{56}$) is a the precursor of all color C_{40} -carotenoids, including β -carotene, has purple-pink color. Its molecule has 11 conjugated double bonds, which connect and neutralize free electrons and prevent damage of the cells. According to clinical studies lycopene reduces growth of cancer cells, especially reproductive cells and lycopene therapy improves reproductive function [10].



The high content of lycopene is in tomatoes (0.4–0.9 mg/g dry weight, depending on the sort), as well as in grapefruit, persimmon and watermelon. Except the plants, lycopene is formed fungi and microorganisms. Its industrial producers is *Blakeslea trispora* (0.8–1.0 g/l), in which there have been blocked enzymes that convert lycopene to beta-carotene by diphenylamine [8].

Mutants with constitutively form carotenoids lycopene and beta-carotene were obtained in colorless strain *S. globisporus* 1912 in the Department of Genetics of Microorganisms in 1998, among which the attention was attracted to the variant *S. globisporus* 1912-4 Lcp [5]. It accumulates only one carotenoid lycopene in an amount of 1.5–2.2 mg/g dry biomass (DBM). In 2010, in order to obtain highly productive and stable mutants – lycopene producers for this strain used a series of mutagenesis. As a result, there were selected a mutant strain of *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7, which obtained the ability to accumulate 4.2 mg/g DBM after of treatment inoculum by hydrogen peroxide in amount of 0.5% after 24 h of liquid cultivation [1]. Such accumulation of lycopene was the highest among described in the literature carotenoid biosynthesis streptomycetes, but during three years synthesis of lycopene has decreased to 2.8 mg/g DBM. It can be concluded that in spite of the constitutive character the synthesis of lycopene and presence of stress-factor (H_2O_2), a producer needs regular amplification of measures of gene expression of carotenogenesis.

Therefore, our aim was to determine the cause of decreased synthesis of lycopene in strain *S. globisporus* 1912-4Lcp Hp7 in liquid medium and to choose the best component structure of medium and cultivation conditions to stabilize the carotenogenesis process.

Materials and methods

For work there were used lycopene producer *S. globisporus* 1912-4Lcp Hp7. Selection of the culture medium was carried out to using standard culturing for streptomycetes natural flour: corn, oats, soybean meal, they were compatible combinations and products of grain processing: wheat and rye bran. Their main composition is given in Table 1 [4].

Table 1

The composition of the main components of natural substrates (%) [4]

Raw material	Protein	Lipid	Mono-saccharide	Carbohydrates	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	P ⁵⁺	Fe ²⁺
Corn flour	7.2	1.5	1.3	68.9	0.04	1.47	0.20	0.36	1.09	0.03
Soy flour	34.9	17.3	5.7	3.5	0.06	16.07	3.48	2.26	6.03	0.15
Oat flour	10.0	6.2	1.1	36.5	0.37	4.21	1.17	1.35	3.61	0.05
Wheat bran	12.5	1.9	3.4	61.3	Traces	Traces	0.39	0.94	3.36	0.04
Rye bran	10.7	1.6	5.6	63.4	0.19	Traces	0.43	0.75	2.56	0.04



For monomediums we brought respectively flour 40 g/L. In medium from soybean we added 10 g/l of starch to balance the carbohydrates with present in it high rate protein. Combined medium consisted of 20 g/l of the substrates. Salts NaCl (5.0 g/l) and CaCO₃ (3.0 g/l) were brought in all medium.

Feature selection of the culture of early and intensive lycopene synthesis was carried out on agar medium, followed by siftings individual colonies on agar surface plates. The most productive superficial mycelium (7–10 day) have been put in the conical Erlenmeyer flask (750 ml) and have been grown for 40–48 h in liquid continuous. Substrate served with corn-soybean liquid culture medium. The inoculum in the amount of 10% has been contributed to the appropriate fermentation medium and cultured on a shaker at 260 rev/min for 72 h 28 °C. The initial value pH was regulated by HCl or NaOH. The studied temperatures were 21, 28 and 37 °C.

The influence of organic salts in concentration of 0,5 % were determined on liquid corn-oatmeal medium. The effect of metals on the biosynthesis of lycopene was observed on agar medium after making in holes 0,1 ml 1% solution of metal salt: Ca(NO₃)₂, CaCl₂, MgCl₂, FeCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, CuSO₄, FeSO₄, (NH₄)₂MoO and except KMnO₄ – 0,05% after 48 hours of incubation at 28 °C. Then optimal concentrations of suitable salts were determinated.

The biomass accumulation was determined after washed by distilled water of medium, centrifugated at 5000 rev/min for 10 minutes, dried at 60 °C to constant weight and was weighed. Then biomass (10 mg) was ground with quartz sand in a porcelain pounder, lycopene was extracted by acetone and selected solution was centrifuged at 12000 rev/min for 3–5 min. The quantitative content of lycopene (X, g) was defined by the formula [7]:

$$X = A \times y/100E,$$

A – absorption of the sample at 472 nm on a spectrophotometer Beckman DU-8B;
 n – the amount of pigment solution, ml; E – extinction coefficient of lycopene 3450.

Results and discussion

To begin, it should be noted that the method of obtaining in 2010 the mutant strain *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 was specific. Nearly lethal dose of hydrogen peroxide (2%) was put in liquid corn-soy media for 24 h culturing strain *S. globisporus* 1912-4 Lcp, was grown one day and was seeded on similar agar medium. The 28 variants with able to early synthesis of lycopene (48 h) were selected from the surface of agar, but only a mutant strain of *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 was stable to this sign. It was observed that after cultivation with the introduction of hydrogen peroxide mycelium had visually intense color than colonies on agar. It was established that accumulation of lycopene was 4.2+0.05 mg/g DBM in making hydrogen peroxide (2%) for 24 h, without making peroxide – 2.8+0.05 mg/g DBM. Contributed to the intensification of the lycopene synthesis and unlimited biomass concentration of hydrogen peroxide (0.5%) was picked up. It was thought that peroxide increases of synthesis of the lycopene in producer cells and limits the growth colorless variants.



Through this practice, while lycopene yield was consistently high and did not need to change methods of cultivation. But later we began to observe a gradual decrease in carotenoid synthesis to 2.8 mg/g DBM. It has been suggested that besides intracellular antioxidant components (lycopene) the producer increased the synthesis of extracellular enzymes protection. Its ability to neutralize oxygen free radicals in the medium, reduce their impact on the cells that promoted the normal growth of colorless variants. This hypothesis was suggested but not investigated.

Therefore, based on the property of the strain *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 to accumulate lycopene in an amount of 4.2 mg/g DBM it was decided to begin to define the optimal culture media for this. As a result of cultivation it was determined that the accumulation of biomass has contributed the corn meal, due to its high content of carbohydrate composition (Table 2). The synthesis of lycopene was the highest on media with soy and especially oat. This parameter may indicate the content material stress or carotenoids predecessors in the seeds of these plants. Last comes to mind because of the high lipid content in these natural substrates they are used to enhance carotenogenesis for cultivation of yeast [6]. Unfortunately, the cultivation of producer on cheap substrates – wheat and rye bran were justified hope. Probably, it did not satisfy microorganisms in the required amount of nutrients (Table 1).

Table 2

**Accumulation of biomass and synthesis of lycopene
by strain *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7**

Medium	Biomass, g/l	Lycopene, mg/g dry biomass	Lycopene, mg/l medium
Corn	14.8±1.0	2.6±0.05	38.48±1.0
Soy	10.0±1.0	3.5±0.05	35.00±1.0
Oat	14.3±1.0	3.5±0.05	50.05±1.0
Corn-soy	14.8±1.0	2.8±0.05	41.44±1.0
Corn-oat	14.8±1.0	3.5±0.05	51.80±1.0
Soy-oat	13.0±1.0	3.5±0.05	45.50±1.0
Wheat bran	8.0 ± 1.0	1.5±0.05	12.00±1.0
Rye bran	6.5 ± 1.0	1.0±0.05	6.5±1.0

After cultivation of producer into liquid medium the suspension of mycelia was selected and put on similar agar medium. So visually the cause of the difference activities in media with corn flour and bran were identified. In the first case, the reason was the formation of uncolor colonies, and in the second – a decrease of the synthesis of the metabolite. The frequency of accumulation of uncolor colonies with using cornmeal was averaged 1×10^{-3} , which had a negative effect on the result. On the other hand, it is impossible to refuse from making corn flour, as it contributes to



the development of surface mycelium and the accumulation of biomass for inoculum. In addition, surface mycelium on corn media has grown the best and was facilitated for getting the accumulation of cultivated material. Surface mycelium on soy and oat medium developed hardly. So corn-oat medium was used for further studies.

After several cultivation in liquid corn-oat medium it was observed that it eventually lost its effectiveness. It was therefore decided, without changing the media, to explore necessary conditions substances that would help to stabilize carotenoid synthesis in submerged conditions.

The analysis of the growth conditions and lycopene synthesis by *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 were started from determination of the initial pH and temperature of cultivation (Fig. 1a). It is known that rate of pH 7.0–8.0 contributes to lycopene accumulation, whereas the products of metabolism of streptomycetes are lower pH [6].

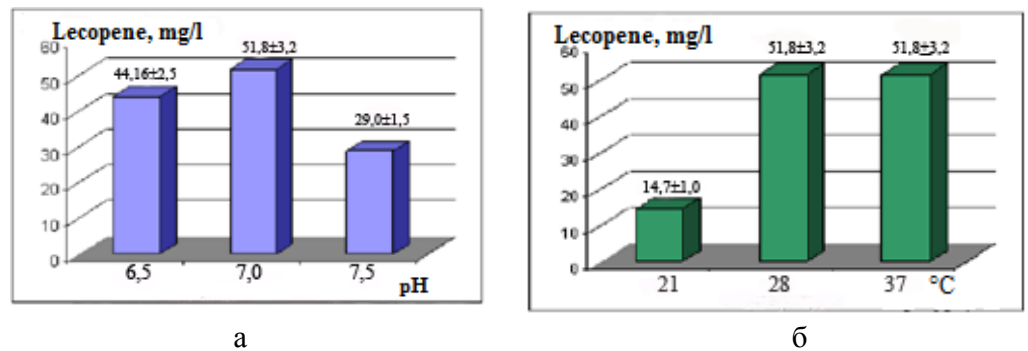


Fig.1. Yield of lycopene from *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 with different pH (a) and temperature of cultivation (b)

It is necessary to note that the medium contained a sufficient amount of the calcium carbonate (CaCO_3), which limited the formation of H^+ ions and prevented shift pH in the acid area. Synthesis of lycopene appeared to be very sensitive to small variations pH. Favorable for the accumulation of carotenoid pigment was neutral initial pH. A slight shift of the neutral reduced productivity of the culture. The fact of low yield of lycopene after culturing mutant at 21 °C is very interesting. It is only 7 °C lower than the standard temperature of streptomycetes cultivation (28 °C) [4]. The maximal synthesis of lycopene has been expected at 37 °C due to the stress effects described in the literature [8]. This fact can be used to restore the activity of the producer in the event of another decrease if it is economically feasible.

It is known that organic acids have a significant impact on carotenoid biosynthesis [3]. Organic acids were used as sodium salts (Table 3). Ammonium salts in some cases have reduced the synthesis of lycopene in the producer Hp7. It has previously been shown by us [2]. At first we were analyzing the pH after cultivation. Potassium-sodium tartrate 4-aqueous did not contribute to the synthesis of lycopene. Adding of other sodiums have led to mean pH 8.0–9.0 that has been productively.

Table 3

**The effect of organic compounds on the performance
of *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7**

Salts of organic acids	pH	Biomass. g/l	Lycopene. mg/g dry biomass	Lycopene. mg/l medium
Control	8.0	14.8±1.0	3.5±0.05	51.80±1.0
Sodium acetate	9.0	15.5±1.0	3.2±0.05	49.60±1.0
Sodium citrate	8.5	16.5±1.0	3.2±0.05	52.80±1.0
Sodium tartrate 4-aqueous	5.5	Traces	Traces	Traces
Sodium casein	9.0	15.0±1.0	4.2±0.05	63.00±1.0
Sodium succinate	8.5	16.8±1.0	3.2±0.05	53.76±1.0

It was detected that salt can be used to enhance the synthesis of biomass. Citrate and succinate sodiums have increased biomass by at least 10%, acetate salt by 5%, but have decreased the synthesis of lycopene. The productive effect on the synthesis of lycopene has got sodium casein, it may indicate the contents of stress substances or precursors of carotenoids. On the other hand, the salt is an expensive substrate, and it can be kept in mind when growing biotech demand producer.

Table 4

**The effect of nonorganic salts on synthesis of lycopene and growth
of *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7**

Salts	Growth strain	Lycopene biosynthesis
Ca(NO ₃) ₂	Not affected	Not affected
CaCl ₂	Not affected	Not affected
MnCl ₂	Not affected	Not affected
FeCl ₃	Delays in 7 mm	Absent
ZnSO ₄	Suppresses	Absent
MgSO ₄	Enhances	Enhances
CuSO ₄	Delays in 12 mm	Absent
FeSO ₄	Delays in 5 mm	Absent
KMnO ₄	Enhances	Enhances
(NH ₄) ₂ MoO ₄	Enhances	Enhances



Cultivation is economically viable with the introduction of nonorganic salts. In order to determine the effect of metal ions on the biosynthesis of carotenoids were tested salt: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, ZnSO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , FeSO_4 , KMnO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, CuSO_4 [3, 6, 8]. Salts of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , MnCl_2 did not affect the strain performance. FeCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 inhibited the growth of the strain. MgSO_4 , KMnO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ have been suitable. The last two are known as oxidants, and they may contribute to the synthesis of lycopene as stress factors.

$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ is used as fertilizer for plants [9]. In further studies, it was found necessary concentration of metal salts for the cultivation Hp7: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1%; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ – 0.05%; KMnO_4 – 0.001%. Their combined using has activated synthesis of lycopene and 4.2 mg/g DBM, which was characteristic for obtained producer in 2010. $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, KMnO_4 improve redox potential, that has affect for aeration and the ability to obtain good results at medium volume 100–150 ml, while still working volume did not exceed 60 ml.

Permanganate as a toxic substance was decided to use only for the selection of the producer, and in the case of performance degradation it could be used for stimulation of the synthesis of lycopene.

Thus, available components for the performance of the strain *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 have been analyzed, it should continue to be useful in the case of reducing its activity. At present, selection and obtaining of inoculum producer and cultivation is carried out by using the medium of the following composition (g/l): corn flour – 20.0; oat flour – 20.0; NaCl – 5.0; CaCO_3 – 3.0; MgSO_4 – 0.1%; $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ – 0.05% and conditions: initial pH 7, 28 °C, V_{in} 10 ml, V_{med} 100 ml.

С.Л. Голембіовська, Т.В. Дворник, Л.М. Янченко, Б.П. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології НАНУ, вул. Заболотного 154,
Київ, МСП, ДО3680, Україна, e-mail: golembiowska@ukr.net

ПРОДУКТИВНІСТЬ МУТАНТНОГО ШТАМУ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-4 LCP HP7 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Реферат

Мета. Визначення причини зниження синтезу каротиноїда лікопіну в умовах глибинного вирощування з 4,2 до 2,8 мг/г сухої біомаси у штама *Streptomyces globisporus* 1912-4Lcp Hp7 та підбір компонентного складу середовища і оптимальних умов, які б сприяли стабілізації цього процесу. **Методи.** Селекцію продуцента здійснювали за ознакою раннього синтезу лікопіну. Селекціоновану культуру глибинно вирощували за різних умов. Біомасу визначали ваговим методом, кількість лікопіну – спектрофотометрично. **Результати.** Причиною зниження активності продуцента лікопіну *S. globisporus* 1912-4Lcp Hp7 в умовах глибинного вирощування виявилася дисоціація культури з утворенням безпігментних варіантів з частотою 1×10^{-3} , що спостерігали після розсіву суспензії міцелію на агаризованому середовищі. Як з'ясувалося, їх накопичення викликане внесенням



в середовище культивування кукурудзяного борошна, яке в поєднанні з вівсяним застосовують і по сьогоднішній день, тому що саме це джерело вуглецю та енергії сприяло накопиченню біомаси продуцента. Визначено умови культивування продуцента: рН 7,0, 28°C, $V_{\text{інок}}$ 10 мл, $V_{\text{серед}}$ 100 мл та концентрації солей: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1\%$, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 - 0,05\%$, які стабілізують процес біосинтезу лікопіну в умовах глибинного вирощування. Показано, що лікопіногенезу сприяє також внесення казеїновокислого натрію і температура 37 °С та KMnO_4 , який застосовують для селекції культури. **Висновки.** Встановлено причину зниження біосинтезу лікопіну у штаму *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 та визначено середовище, оптимальні умови і солі, які стабілізують процес біосинтезу лікопіну у продуцента в умовах глибинного вирощування.

Ключові слова: стрептоміцети, штам продуцент, синтез лікопіну.

С.Л. Голембiovская, Т.В. Дворник, Л.М. Янченко, Б.П. Мацелюх

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Заболотного 154,
Киев, МСП, ДО3680, Украина, E-mail: Golembiovska@ ukr.net

ПРОДУКТИВНОСТЬ МУТАНТНОГО ШТАММА *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-4 LCP HP7 В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Реферат

Цель. Определение причины снижения синтеза каротиноида ликопина в условиях глубинного выращивания с 4,2 до 2,8 мг/г сухой биомассы штамма *Streptomyces globisporus* 1912 4Lcp Hp7 и подбор компонентного состава среды и оптимальных условий, которые бы способствовали стабилизации этого процесса. **Методы.** Селекцию продуцента осуществляли по признаку раннего синтеза ликопина. Селекционированию культуру глубинно выращивали при разных условиях. Биомассу определяли весовым методом, количество ликопина – спектрофотометрически. **Результаты.** Причиной снижения продуктивности штамма *S. globisporus* 1912 4Lcp Hp7 в условиях глубинного выращивания оказалась диссоциация культуры с образованием беспигментные варианты с частотой 1×10^{-3} , которую наблюдали после посева суспензии мицелия на среде с агаром. Как выяснилось, их накопление вызвано внесением в среду культивирования кукурузной муки, которую в сочетании с овсяной применяют и по сегодняшний день, потому что именно этот источник углерода и энергии способствовал накоплению биомассы продуцента. Определены условия культивирования продуцента: рН 7,0, 28 °С, $V_{\text{інок}}$ 10 мл, $V_{\text{серед}}$ 100 мл и концентрации солей: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,1\%$, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 - 0,05\%$, которые стабилизируют процесс биосинтеза ликопина в условиях глубинного выращивания. Показано, что биосинтезу ликопина способствует также внесение казеиновокислого натрия и температура 37 °С, а также KMnO_4 , который применяют для селекции культуры. **Выводы.** Установлена причина снижения биосинтеза ликопина у штамма *S. globisporus* 1912-4 Lcp Hp7 и определены среда, оптимальные условия и соли, которые стабилизируют этот процесс у продуцента в условиях глубинного выращивания.

Ключевые слова: стрептомицеты, штамм продуцент, синтез ликопина.



REFERENCES

1. Golembiovskaya S.L., Lavrenchuk V.J., Matselyukh B.P. Selection of high-performance mutants in lycopene // Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology. – 2012. V. 4 – P. 334–338.
2. Golembiovskaya S.L., Tymoshenko S.G., Matselyukh B.P. Influence of carbon and nitrogen sources on biosynthesis of lycopene in *Streptomyces globisporus* 4LCP // Microbiol. Journal – 2010. – V. 72, № 6. – P. 46–51.
3. Kiritsa Elena. The directed synthesis of carotenoids by yeasts and the perspectives of its use: Dissertation of Dr. in biology. Chisinau – 2005, p.129.
4. Practical medium for actinomycetes and fungi. Directory. / ed. By S.M.Semenova. – M: Мир, 1978. – 140 p.
5. Matselyukh B.P., Lutchenko V.A., Polishchuk L.V Synthesis of carotenoids by mutant strains of *Streptomyces globisporus* 1912 // Microbiol. Journal – 2003. – V.65, N 6. – P. 24–30.
6. Feofilova E.P. Fungal carotenoids: biological functions and practical use // Prikl Biokhim. Mikrobiol. – 1994 – V 30(2) – P. 181–196.
7. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. – V. 111. Steroids and Isoprenoids. Part B. / Ed. J.H. Law, H.C. Rilling. – Orlando, San Diego etc.: Academ. Press. – 1985. – P. 113–149.
8. Choudhari S.M., Ananthanarayan L., Singhal R.S. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of beta-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* // Bioresour. Technol. – 2008. – 99, № 8. – P. 3166–3173.
9. <http://selo-delo.ru/8-zemelnie-resursi?start=47>
10. Stahl W.N. Lycopene: a biologically important carotenoid for human. // Arch. Biochem. Biophys. – 1996. – V. 336. – P. 1–9.

Стаття надійшла до редакції 22.04.2014 р.



Muchlis Abedalabas, M.B. Galkin, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ONU 301 IN THE PRESENCE OF EXOGENOUS SIGNALING QUINOLONE

Aim: Discovery of the *P. aeruginosa* ONU 301 rhamnolipids biosynthesis and rhamnosyltransferase 2 activity in presence of *Pseudomonas aeruginosa* exogenous quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS). **Methods.** *Pseudomonas aeruginosa* ONU 302 were cultured in the Giss medium with 2% glucose at 37°C 24 h. All discoveries were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunclon» 48-well plates. Di- and monorhamnolipids separation conducted by TLC methods and its content was determined by orcinol test. Rhamnosyltransferase 2 (RhlC) activity was analysed in *P. aeruginosa* cell extracts using a rhamnosyltransferase assay specific for the addition of L-rhamnose to monorhamnolipid. **Results.** After 16 h of growth, there is approximately 4.2 times more biosurfactant in cultures supplemented with PQS compared with the control. After 24 hours its level in culture medium was 16.0 mg/ml in the presence of 80 µM PQS and 3.7 mg/ml in the absence of PQS. The dirhamnolipids content in control culture after 8 hours was less than the monorhamnolipids. But after 24 hours its level was in 2.86 time higher. The dirhamnolipid/monorhamnolipid ratio increased 24 hours later in 1.25; 1.55 and 2.25 times in presence of 40, 60 and 80 µM signaling quinolon concentration, respectively. The additions of PQS at the time of inoculation are sufficient to induce RhlC activity during the transition to stationary phase. So, after eight hours in the presence of 40, 60 or 80 µM PQS rhamnosyltransferase 2 activity was 1.5, 1.9 and 2.2 times higher as compared with the control. After 24 hours this enzymatic activity was higher at 45%, 85% and 110%, respectively. **Conclusion.** It is concluded that, *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS) can be used in biothechnology to increase the yield of biosurfactants and enrich them with dirhamnolipids

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids, PQS, rhamnosyltransferase 2.

Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids have a wide spectra of biological activity, especially antimicrobial and antitumor mode of action [10, 13]. Due to its high emulsifying capacity they can be used in bioremediation of the polluted soil [8] and for oil recovery enhancement [15]. *P. aeruginosa* biosurfactants are the rhamnolipids mixture with different molecular structure that mainly consists of di- and monorhamnolipids, that have two fatty acid residues in their structure, mostly β-hydroxydodecanoyl-β-hydroxydodecanoat. Dirhamnolipids are more soluble in water and posses the highest emulsifying and antitumor activity [9].



We have previously shown that the exogenous signal quinolon (PQS) increased rhamnolipids biosynthesis and dirhamnolipid/monorhamnolipid ratio in *P. aeruginosa* PA01, and hypothesized that it could activate rhamnosyltransferase 2 [7].

Three enzymatic reactions are required in the final steps of rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* [12]: 1) RhlA is involved in the synthesis of the HAAs, the fatty acid dimers, from two 3-hydroxyfatty acid precursors; 2) the membrane-bound RhlB rhamnosyltransferase 1 uses dTDP-L-rhamnose and an HAA molecule as precursors, yielding monorhamnolipids; 3) these monorhamnolipids are in turn the substrates, together with dTDP-L-rhamnose, of the RhlC rhamnosyltransferase 2 to produce dirhamnolipids. Unfortunately, few works have characterized these three enzymes [2, 11].

The aim of this study was discovering of *Pseudomonas aeruginosa* ONU 301 rhamnolipids biosynthesis and rhamnosyltransferase 2 activity in presence of the exogenous quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS).

Materials and Methods

Bacterial strain *P. aeruginosa* ONU 301 used in this study was obtained from cultures collections of Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa National Mechnykov University.

All researches were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunclon» 48-well plates. *P. aeruginosa* ONU 301 overnight cultures diluted with sterile saline buffer were added in the plate wells containing 1 ml of Giss media to final cell concentration equal 10^3 CFU. The plates were incubated at 37 °C. Optical density of cultures (λ 540 nm) and rhamnolipids content were determined after 8, 16 and 24 hours.

Rhamnolipids separation was performed with TLC method on Alugram Sil G/UV 254 TLC plates (Germany) in chloroform-methanol-water (65:12:2) mixture [14]. Rhamnolipids spots placement was determined by color reaction with rhamnose and acetic acid–sulphuric acid–anis aldehyde solution (50:1:0.05) and TLC plates were heated at 80 °C till pink-orange staining appearance.

Di- and monorhamnolipids were eluted with chlorophorm. The samples were vortexed at 1500 g for 30 minutes for silica-gel removal. After centrifugation chloroform layer was taken away and evaporated. Residue was diluted at 100 μ M and rhamnolipids concentration were determined using orcinol-assay [4]. Dirhamnolipids/monorhamnolipids ratio was calculated taking monorhamnolipids content as 1 unit.

Rhamnosyltransferase 2 activity was analysed in *P. aeruginosa* cell extracts using rhamnosyltransferase assay specific for the addition of L-rhamnose to monorhamnolipid [11]. Cells from stationary phase cultures were washed with 100 mM Tris-100 mM NaCl buffer, pH 7, and ruptured by sonication. Whole-cell extracts were incubated with 0.5 mg of dTDP-L-rhamnose and 1.5 mg of monorhamnolipid for 4 h at 37 °C. Monorhamnolipid used in the assay was purified from *P. aeruginosa* strain ATCC 9027, which lacks the ability to produce dirhamnolipid [16]. Dirhamnolipids were separated by TLC and determined using orcinol-assay [4]. One transferase unit



corresponds to the incorporation of one nmol of rhamnose from TDP-rhamnose into monorhamnolipid per hour. The total protein content of the whole-cell extracts was determined by using the Lowry method [5].

We used in this work 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon that was synthesizing in ONU Biotechnological scientific-educational center, TDP-rhamnose was obtained from PhD V. Osetrov. PQS was used at concentrations of 40, 60 and 80 μM . Data about physiological concentration of autoinducers were used while concentrations choosing.

All experiments were carried out triple with 6 repeats in each case.

Data are reported as the mean \pm standard deviation. Reliability of differences was determined by Student's criterion at a significance level of not less than 95% ($p \leq 0.05$). All mathematics calculations were performed using the computer program Excel.

Results and Discussion

McKnight S. et al. have demonstrated that PQS production is also initiated in early stationary phase [6] and production of rhamnolipids are reduced in PQS-deficient mutants [3]. All these data suggest an important role of *P. aeruginosa* quinolone signal in the synthesis of biosurfactants. Therefore, we studied the effect of exogenous PQS on the planctonic cells growth and ramnolipids biosynthesis.

The results show that addition of increasing concentrations of PQS does not affect the growth of *P. aeruginosa* ONU 301. These results coincide with data [3] showed that of exogenously added PQS at concentrations from 10 to 100 μM do not affect the growth of *P. aeruginosa* PAO1 *lecA::lux*.

Addition of increasing concentrations of PQS enhanced rhamnolipids content in a concentration-dependent manner (Fig.).

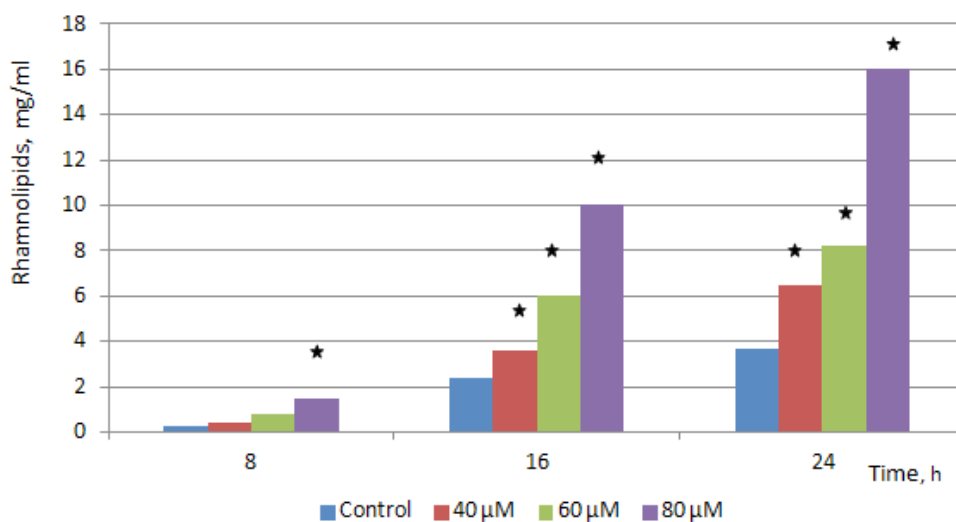


Fig. Kinetics of *P. aeruginosa* ONU 301 rhamnolipids biosynthesis in presence of quinolone signal molecule

Note: – distinctions are reliable as compared to control



The results presented in Fig. show that the addition of PQS at concentration 80 μM had the greatest effect on the rhamnolipids biosynthesis. After 16 h of growth, there is approximately 4.2 times more biosurfactant in cultures supplemented with PQS compared with the control. After 24 hours its level in culture medium was 16.0 mg/ml in the presence of 80 μM PQS and 3.7 mg/ml in the absence of PQS.

In the presence of 60 μM PQS rhamnolipids content was 8.2 mg/ml – 2.2 times greater than the control but less than 2 times from result obtained at adding of 80 μM PQS.

The exogenous signal quinolon not only increased total rhamnolipids biosynthesis, but also dirhamnolipid/monorhamnolipid ratio in *P. aeruginosa* ONU 301. The data presented in Table 1 show that dirhamnolipids fraction increases with the time of cultivation and that *P. aeruginosa* ONU 301 show greatly influences on the dirhamnolipids biosynthesis at concentration 80 μM .

Table 1

Effect of PQS on dirhamnolipids/monorhamnolipids ratio

	8 hour	16 hour	24 hour
Control	0.7 : 1	1.4 : 1	2.0 : 1
PQS 40 μM	1.4 : 1	2.0 : 1	2.5 : 1
PQS 60 μM	1.4 : 1	2.1 : 1*	3.1 : 1*
PQS 80 μM	1.7 : 1*	3.2 : 1*	4.5 : 1*

Note: Dirhamnolipids/monorhamnolipids ratio was calculated taking monorhamnolipids content as 1 unit;

* – distinctions are reliable as compared to control

The dirhamnolipids content in control culture after 8 hours was less than the monorhamnolipids. But after 24 hours its level was in 2.86 time higher. The dirhamnolipid/monorhamnolipid ratio increased 24 hours later in 1.25; 1.55 and 2.25 times in the presence of 40, 60 and 80 μM signaling quinolon concentration, respectively. Thus, the PQS increases the proportion of dirhamnolipids in the total biosurfactants mixture which is synthesized by *P. aeruginosa* ONU 301.

Further there were performed the analysis of activity of rhamnosyltransferase 2 (RhIC), which catalyses the addition of dTDP-L-rhamnose to the monorhamnolipid-accepting molecule [2]. The study was conducted via 8, 16 and 24 hours of cultivation (Table 2).

The results indicate that the activity of RhIC increases in control cells 2.7 times during cultivation from 8 to 24 hours. This increase in activity is not associated with increased cell contents but due to enhanced expression of *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2. The additions of PQS at the time of inoculation are sufficient to induce RhIC activity during the transition to stationary phase. So, after eight hours



in the presence of 40, 60 or 80 μ M PQS rhamnosyltransferase 2 activity was 1.5, 1.9 and 2.2 times higher as compared with the control. After 24 hours this enzymatic activity was higher at 45%, 85% and 110%, respectively.

Table 2

**Effect of PQS on rhamnosyltransferase 2 activity
in *Pseudomonas aeruginosa* ONU 301 (units/mg protein)**

Variant \ Time	8 hour	16 hour	24 hour
Control	2.9 \pm 0.7	5.6 \pm 0.9	7.8 \pm 2.3
PQS 40 μ M	4.3 \pm 1.2	7.8 \pm 1.3	11.3 \pm 2.4
PQS 60 μ M	5.6 \pm 1.1	10.1 \pm 1.8	14.5 \pm 2.9*
PQS 80 μ M	6.5 \pm 2.0*	12.6 \pm 2.2*	16.4 \pm 3.1*

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

We have previously shown that exogenous PQS has the same effect on the rhamnolipids biosynthesis of other strains of *P. aeruginosa* [7]. As it is known *P. aeruginosa* regulates the transcription of an array of genes by quorum sensing [11]. In the case of rhamnolipids biosynthesis, the product of RhlI is the signal butanoyl-homoserine lactone, C4-HSL, which acts as the activating ligand of the transcriptional regulator RhlR. The RhlR/C4-HSL complex then binds to a specific sequence in the *rhlAB* regulatory region to activate the transcription. The level of expression of *rhlAB* is thus dependent on the local environmental concentration of this signal. The expression of the second rhamnosyltransferase, encoded by *rhlC*, is coordinately regulated with *rhlAB* by the same quorum sensing regulatory pathway. As it has been shown previously, addition of increasing concentrations of exogenous PQS enhanced C4-HSL levels (3.5 times more C4-HSL in the presence of 60 μ M PQS compared with the control) and the transcription of certain genes in a concentration-dependent manner [3].

Therefore, PQS controls production of rhamnolipids by stimulating the RhlR/C4-HSL quorum sensing system. Additionally, PQS act as inducing ligands of PqsR regulator and PqsE which upregulates *rhlAB* transcription [1].

It is concluded that, *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS) can be used in biotechnology to increase the yield of biosurfactants and enrich them with dirhamnolipids.

Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

БІОСИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ONU 301 ЗА ПРИСУТНОСТІ ЕКЗОГЕННОГО СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ

Реферат

Мета: дослідження біосинтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* ONU 301 та активності рамнозилтрансферази 2 за присутності екзогенної сигнальної молекули – 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS). **Методи.** *Pseudomonas aeruginosa* ONU 301 культивували у середовищі Гісса с 2% глюкози при 37°C 24 год. Дослідження проводили в системі планктон-біоплівка у 48-лункових пластинах «Nunclon». Виділення дирамноліпідів проводили за використання ТШХ на пластинах Alugram Sil G/UV 254. Дирамноліпідів елюювали з пластин і визначали їх кількісний вміст за допомоги орцинового тесту. Активність рамнозилтрансферази 2 (RhIC) аналізували у безклітинному екстракті за реакцією приєднання L-рамнози до монорамноліпиду. 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон був синтезований у Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І.І. Мечникова. **Результати.** Через 16 годин вміст рамноліпідів перевищував рівень контролю приблизно у 4,2 рази. Через 24 години вміст біосурфактантів в присутності 80 мкМ PQS становив 16,0 мг/мл проти 3,7 мг/мл за відсутності PQS. Вміст дирамноліпідів у контрольній культурі через 8 год був меншим ніж монорамноліпідів, у той же час, через добу його рівень був більшим у 2,86 разу. Співвідношення дирамноліпід/монорамноліпід через 24 год підвищувалося у 1,25; 1,55 та 2,25 рази за присутності 40, 60 і 80 мкМ сигнального хінолону, відповідно. Внесення PQS одночасно з інокуляцією суттєво індукувало активність RhIC у порівнянні з контролем. Так, через вісім годин за присутності 40, 60 або 80 мкМ PQS активність рамнозилтрансферази 2 зростала у 1,5; 1,9 і 2,2 рази у порівнянні з контролем. Через 24 години ферментативна активність перевищувала контроль на 45%, 85% та 110%, відповідно. **Висновки.** Сигнальний хінолон *Pseudomonas aeruginosa* (PQS) може бути використаний в біотехнології для підвищення виходу біосурфактантів та збагачення їх суміші дирамноліпідами.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa* дирамноліпідів, PQS, рамнозилтрансфераза 2.



Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

БІОСИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ONU 301 В ПРИСУТСТВІИ ЕКЗОГЕННОГО СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА

Реферат

Цель: изучение биосинтеза рамнолипидов *P. aeruginosa* ONU 301 и активности рамнозилтрансферазы 2 в присутствии экзогенной сигнальной молекулы – 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS). **Методы.** *Pseudomonas aeruginosa* ONU 301 культивировали в среде Гисса с 2% глюкозы при 37°C 24 часа. Исследования проводили в системе планктон–биоплёнка в 48-луночных планшетах «Nuncлон». Выделение дирамнолипидов осуществляли с помощью ТСХ на пластинах Alugram Sil G/UV 254. Дирамнолипиды элюировали с пластин и определяли их количественное содержание с помощью орцинового теста. Активность рамнозилтрансферазы 2 (RhIC) анализировали в бесклеточном экстракте по реакции присоединения L-рамнозы к монорамнолипиду. 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон был синтезирован в Биотехнологическом научно-учебном центре ОНУ имени И.И. Мечникова. **Результаты.** Через 16 часов содержание рамнолипидов превышало уровень контроля примерно в 4,2 раза. Через 24 часа содержание биосурфактантов в присутствии 80 мкМ PQS составляло 16,0 мг/мл против 3,7 мг/мл в отсутствии PQS.

Содержание дирамнолипидов в контрольной культуре через 8 часов было меньше чем монорамнолипидов, в то же время, через сутки его уровень был выше в 2,86 раза. Соотношение дирамнолипид/монорамнолипид через 24 часа увеличивалось в 1,25; 1,55 и 2,25 раза в присутствии 40, 60 и 80 мкМ сигнального хинолона, соответственно. Внесение PQS одновременно с инокуляцией существенно индуцировало активность RhIC по сравнению с контролем. Так, через восемь часов в присутствии 40, 60 и 80 мкМ PQS активность рамнозилтрансферазы 2 повышалась в 1,5; 1,9 и 2,2 раза. Через 24 часа ферментативная активность превышала контроль на 45%, 85% и 110%, соответственно. **Выводы.** Сигнальный хинолон *Pseudomonas aeruginosa* (PQS) может быть использован в биотехнологии для повышения выхода биосурфактантов и обогащения их смеси дирамнолипидами.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, дирамнолипиды, PQS, рамнозилтрансфераза 2.



REFERENCES

1. *Abdel-Mawgoud A.M., Hausmann R., Lépine F., Müller M.M., Déziel E.* Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production / In: G. Soberon-Charvez (ed.), *Biosurfactants. From Genes to Application* // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2011. – VIII. – P. 13–55.
2. *Burger M.M., Glaser L., Burton R.M.* The enzymatic synthesis of a rhamnolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Biol. Chem.* – 1963. – V. 238. – P. 2595–2602.
3. *Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Camara M., Williams P.* The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR // *Mol. Microbiol.* – 2003. – V. 50. – P. 29–43.
4. *Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J.* Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. // *J. Bacteriol.* – 1991. – V. 173. – P. 4212–4219.
5. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193. – P. 265–275.
6. *McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C.* The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Bacteriol.* – 2000. – V. 182. – P. 2702–2708.
7. *Mukhlis Abedalabas, Galkin N.B., Pachomova E. Yu., Filipova T.O.* Influence of the exogenous quorum sensing autoinducers on *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids biosynthesis // *Microbiol. & Biotechnol.* – 2013. – V. 4(24). – P. 38–45.
8. *Nguyen T.T., Youssef N.H., McInerney M.J., Sabatini D.A.* Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation // *Water Research.* – 2008. – V. 42. – P. 1735–1743.
9. *Peker S., Helvaci S. S., Özdemir G.* Interface-subphase interactions of rhamnolipids in aqueous rhamnolipid solutions // *Langmuir.* – 2003 – V. 19. – P. 5838–5845.
10. *Piljac G., Piljac V.* Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid. // USA Patent № 5455232, 3 Oct. 1995.
11. *Rahim R., Ochsner U.A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Joseph S. Lam J.S., Soberon-Chavez G.* Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 40. – P. 708–718.
12. *Soberon-Chavez G., Lépine F., Déziel E.* Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – V. 68. – P. 718–725.
13. *Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F., Dorey S.* Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes // *Int. J. Molecular Sci.* – 2010. – V. 11. – P. 5095–5108.
14. *Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P.* Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste



frying oil as low cost carbon source // *Prep. Biochem. & Biotechnol.* – 2012. – V. 42. – P. 249–266.

15. Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J., Liang X.L., Shuler P.J., Goddard W.A., Tang Y.C. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery // *Biotech. Bioeng.* – 2007. – V. 98. – P. 842–853.

16. Wild M., Caro A.D., Miller R.M., Soberon-Chavez G. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1997. – V. 153. – P. 279–285.

Стаття надійшла до редакції 01.06.2014 р.



О.В. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП,
Д03680, Україна, тел.: +38(044)526 23 39,
e-mail: oivanko@yahoo.com

СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ СЕРИНОВОЇ ЛУЖНОЇ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS THURINGIENSIS* ІМВ В-7324

Мета. Дослідження субстратної специфічності серинової лужної пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324. **Методи.** Для вивчення субстратної специфічності використовували білки: казеїн, еластин, фібрин, фібриноген, колаген, желатин, гемоглобін. Визначення первинної субстратної специфічності проводили, використовуючи синтетичні хромогенні субстрати. Максимальну швидкість (V_{max}) та константу Міхаеліса (K_m) визначали за методом Лайнуївера-Берка із кривої залежності швидкості ензимної реакції від концентрації субстрату, побудованою за методом подвійних обернених величин в координатах ($1/V-1/[S]$). **Результати.** Показано, що ензим має субстратну специфічність, подібну до протеаз субтилізинового типу, що визначається здатністю гідролізувати специфічні хромогенні субстрати Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а також володіє естеразною активністю. Кінетичні параметри реакції гідролізу специфічного субстрату еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa складають 0,83 мМ (K_m) і 20,1 ммоль·мл⁻¹·хв⁻¹ (V_{max}). **Висновки.** Здатність еластолітичної пептидази *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гідролізувати широкий спектр нативних білків фібрилярної і глобулярної природи обумовлена її специфічністю щодо залишків гідрофобних амінокислот – аланіну, лейцину, фенілаланіну. За кінетичними параметрами виділений ензим не поступається панкреатичній еластазі та є перспективним для практичного застосування.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, еластаза, субстратна специфічність, синтетичні субстрати.

Еластази (або еластолітичні пептидази) – це ряд ендопептидаз, які належать до різних каталітичних типів: серинових, цистеїнових і металопептидаз [7, 13, 17]. Найбільш вивченими є панкреатична і лейкоцитарна еластази (КФ 3.4.21.36, 3.4.21.37 відповідно) вищих тварин, які відносяться до типу серинових пептидаз і специфічні до пептидних зв'язків, що утворені карбоксильними групами аланіна, валіна, лейцина, ізолейцина, а також залишками інших гідрофобних амінокислот. Відомості про синтез і властивості еластаз мікробного походження розрізнені і досить обмежені. Відомо, що такі ензими синтезують окремі представники родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Aspergillus* [3]. Встановлено, що еластаза *P. aeruginosa* (КФ 3.4.24.26) є цинквмісною металопептидазою, а представники бацил синтезують лужні серинові еластолітичні



пептидази. Але, не дивлячись на відмінності у механізмі каталітичної дії, ці ензими однаково ефективно гідролізують еластин.

Раніше [3] було виділено і очищено пептидазу *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 з високою еластазною активністю, визначено оптимальні умови її дії і показано високу стабільність очищеного препарату в досліджуваних діапазонах рН і температур. Нами встановлено, що ензим, крім еластазної, мав ще й фібринолітичну активність. Базуючись на впливі специфічних хімічних реагентів, катіонів металів і аніонів на еластолітичну і фібринолітичну активність, нами було зроблено припущення, що пептидаза *B. thuringiensis* є металактивованою пептидазою і присутність металу в структурі молекули є необхідною в першу чергу для зв'язування високомолекулярних нативних субстратів. Метою даної роботи було дослідження субстратної специфічності серинової лужної пептидази *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була позаклітинна серинова лужна пептидаза штаму *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 з еластазною активністю. Культивування штаму та отримання очищеного ензимного препарату еластолітичної пептидази проводили, як описано раніше [3].

Загальну казеїнолітичну активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [5], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюється при гідролізі казеїну по Гаммерстену. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 670 нм. За одиницю активності приймали здатність ензиму за 1 хв при температурі 37 °С перетворювати казеїн в неосаджений трихлороцтовою кислотою стан в кількості, що відповідає 1 мкмоль тирозину. Для визначення гемоглобінолітичної активності як субстрат використовували гемоглобін, попередньо денатурований 6% розчином сечовини. Порядок визначення активності аналогічний визначенню загальної казеїнолітичної активності [5]. Желатиназну активність визначали за методом Іванова, приймаючи за одиницю активності таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз желатини з утворенням 1 мг азоту за 1 год. Еластазну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [16]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв. Визначення фібринолітичної активності проводили за методом [11], використовуючи як субстрат фібрин. Утворення продуктів розщеплення фібрину вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв. Визначення фібриногенолітичної активності проводили аналогічно фібринолітичній активності, беручи за субстрат фібриноген. За одиницю фібриногенолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв. Колагеназну активність визначали за методом



[10]. Продукти розщеплення колагену визначали в реакції з нінгідрином на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. За одиницю колагеназної активності приймали кількість мкмолей вивільненого лейцину за 1 хв.

Визначення активності пептидаз щодо синтетичних субстратів проводили за методом [10]. Концентрація відщепленого в результаті реакції *para*-нітроаніліду (*pNA*) пропорційна активності пептидази і визначається за збільшенням поглинання при довжині хвилі 405–410 нм. Одиниці активності розраховували за формулою:

$$од / мл = \frac{(A_{410(мест)} - A_{410(контроль)}) \times 3 \times a}{8,8 \times 0,1},$$

де 3 – це об'єм реакційної суміші, мл, а – фактор розведення, 8,8 – мілімолярний коефіцієнт екстинкції для *pNA*, 0,1 – об'єм пептидази в реакції, мл. В реакції застосовували синтетичні хромогенні субстрати («Sigma Aldrich», США).

Для визначенні естеразної активності використовували етиловий ефір *N*-бензоїл-*D,L*-аргініну (БАЕЕ) і метиловий ефір *N*-бензоїл-*D,L*-тирози́ну (БТМЕ). Утворення продуктів гідролізу визначали, вимірюючи оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 253 нм. Одиниця естеразної активності – приріст оптичної густини реакційної суміші на 0,001 за 1 хв. Питому активність виражали в од/мг протеїну.

Максимальну швидкість (V_{max}) та константу Міхаеліса (K_m) визначали за методом Лайнуївера-Берка із кривої залежності швидкості ензимної реакції від концентрації субстрату, побудованою за методом подвійних обернених величин в координатах ($1/V - 1/[S]$).

Усі досліди проводили в 3–5 повторностях і враховували середні значення величин і стандартної похибки ($M \pm m$). Значення при $P < 0,05$ розглядали як вірогідні. Графічно представлені результати отримували за допомогою програми Microsoft Excel 2010.

Результати та їх обговорення

Важливою характеристикою препаратів пептидаз є їх субстратна специфічність. Раніше було показано, що еластаза *Bacillus thuringiensis* є сериновою лужною пептидазою [3]. Дослідження швидкості гідролізу ряду нативних субстратів показало, що цей ензим має широку субстратну специфічність, що є характерним для субтилізинів, які синтезуються бактеріями роду *Bacillus* [8]. Еластаза *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 ефективно гідролізує ряд білкових субстратів як фібрилярної, так і глобулярної природи: еластин, фібрин, фібриноген, казеїн, гемоглобін, колаген і желатин (рис. 1). Також встановлено, що фібриноген, оброблений протягом 15 хв виділеною пептидазою, вже не здатний перетворюватися на фібрин під дією тромбіна.

Широкий спектр природних субстратів, які гідролізує еластаза *B. thuringiensis* може бути зумовлений будовою її каталітичного центру і широким спектром амінокислот, які відповідають її первинній специфічності.



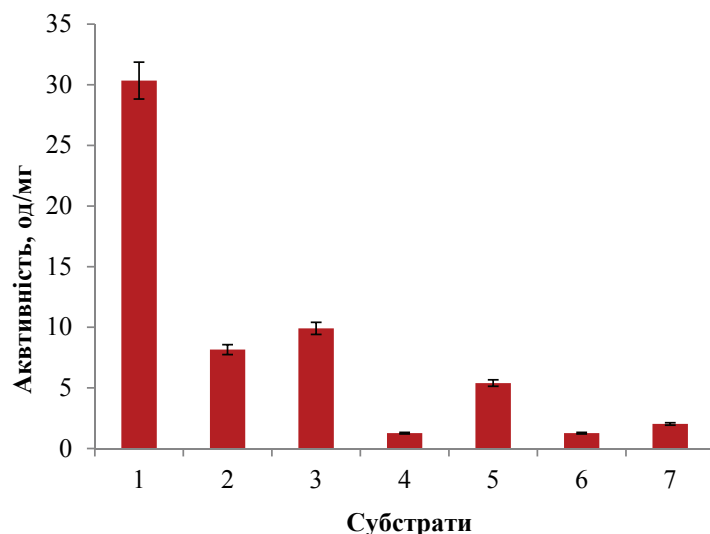


Рис. 1. Активність еластази *B. thuringiensis* IMV B-7324 щодо нативних білків

1 – еластин, 2 – фібрин, 3 – фібриноген, 4 – колаген, 5 – желатин,
6 – гемоглобін, 7 – казеїн

Fig. 1. Activity of *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase toward the native proteins

1 – elastin, 2 – fibrin, 3 – fibrinogen, 4 – collagen, 5 – gelatin,
6 – hemoglobin, 7 – casein

Для з'ясування первинної специфічності еластази використовували синтетичні субстрати, які є характерними для первинної специфічності тваринних і бактеріальних серинових пептидаз. Було показано (табл. 1), що еластаза *B. thuringiensis* має субстратну специфічність, подібну до пептидаз субтилізинового типу (про що свідчить гідроліз субстратів Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa), а також володіє естеразною активністю (гідроліз субстрату БАЕЕ). Найбільш активно ензим гідролізував трипептиди із залишками гідрофобних амінокислот аланіну, лейцину і фенілаланіну в позиції S1. За спорідненістю до цих амінокислот можна побудувати такий ряд: Ala>Leu>Phe. Дані субстрати є специфічними також і для еластаз тваринного походження. Важливими для гідролізу були амінокислоти і вторинної специфічності (позиції S2 і S3). Так, заміна аланіну (субстрати Suc-Ala-Ala-Ala-pNa і Z-Ala-Ala-Phe -pNa) на залишок гліцину (субстрати Z-Gly-Ala-Ala-pNa і Z-Gly-Ala-Phe-pNa) в позиції S3 приводила до зниження активності на більше як 30–80%. Заміна аланіну на гліцин в двох позиціях S2 і S3 (субстрати Z-Ala-Ala-Phe-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa) приводила до зниження активності на 75%. Дані щодо переважного гідролізу пептидазою за залишками гідрофобних амінокислот було підтверджено також результатами тонкошарової хроматографії гідролізатів нативних білкових субстратів [4], що показала наявність в них залишків аланіну, лейцину і валіну. Також цим методом було виявлено наявність в гідролізатах залишків глутаміної амінокислоти, але за відсутністю відповідних хромогенних субстратів дані порівняти неможливо.

Швидкість гідролізу синтетичних субстратів

The hydrolysis rate of the synthetic substrates

Субстрат	Швидкість гідролізу субстрату, ммоль×мл ⁻¹ ×хв ⁻¹
Етиловий ефір N-бензоїл- D,L-аргініну (БАЕЕ)	0,8±0,04
Метилловий ефір N-бензоїл-D,L-тирози́ну (БТМЕ)	0
Glp-Phe-pNa	0
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	5,6±0,28
Z-Ala-Ala-Ileu-pNa	0
Z-Ala-Ala-Phe -pNa	9,4±0,47
Z-Ala-Ala-Ala-pNa	18,5±0,93
Suc-Ala-Ala-Ala-pNa	20,1±1,01
Z-Gly-Ala-Ala-pNa	12,6±0,63
Z-Ala-Ala-Val-pNa	0
Z-Gly-Gly-Phe-pNa	2,3±0,12
Z-Gly-Ala-Phe-pNa	1,8±0,09
Z-Gly-Ala-Leu-pNa	6,4±0,32
Z-Ala-Ala-Pro-pNa	0

Важливою характеристикою каталітичної активності ензиму є кінетичні параметри швидкості гідролізу субстрату. Однією з проблем при вивченні протеолітичних ензимів є встановлення кінетичних закономірностей взаємодії їх з природними білковими субстратами, оскільки, як правило, швидкість таких реакцій не підпорядковується рівнянню Міхаеліса-Ментен. Основна причина відхилень полягає в складності будови білкового субстрату, який являє собою набір пептидних зв'язків, що не лишається постійним в процесі реакції. Показано [1], що найпростіша схема для описання таких процесів включає два етапи: 1) сорбція пептидази на поверхні субстрату, яка містить групи – «мішені» сорбції; 2) безпосередньо каталітичну реакцію між ензимом і реакційно-здатними групами нерозчинного субстрату або розчинних пептидів, які вже утворилися. Було вивчено залежність швидкості гідролізу еластину від часу (рис. 2) і показано, що вона не має класичного гіперболічного вигляду, що може бути зумовлено не тільки утворенням і розпадом ензим-субстратного комплексу і утворенням продуктів реакції, а ще й тим, що спочатку відбувається адсорбція ензиму на нерозчинному субстраті для подальшого ефективного його гідролізу.



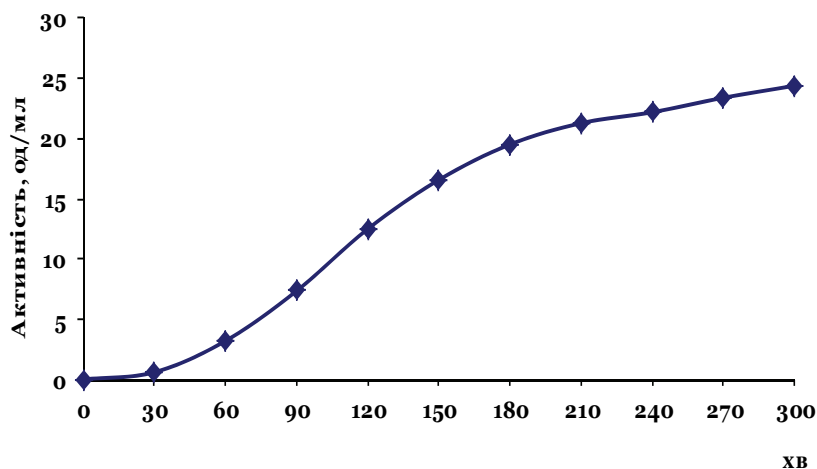


Рис. 2. Динаміка гідролізу нативного еластину еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324

Fig. 2. Dynamic of the native elastin hydrolysis by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase

Тому для вивчення кінетичних параметрів було використано специфічний субстрат еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa. Дослідження показали, що криві залежності активності від часу і концентрації субстрату мають звичайний гіперболічний вигляд і підпорядковуються кінетиці Міхаеліса-Ментен для односубстратних реакцій першого порядку, де має місце поступове збільшення активності, але через деякий час швидкість реакції стає постійною і криві виходять на плато (рис. 3).

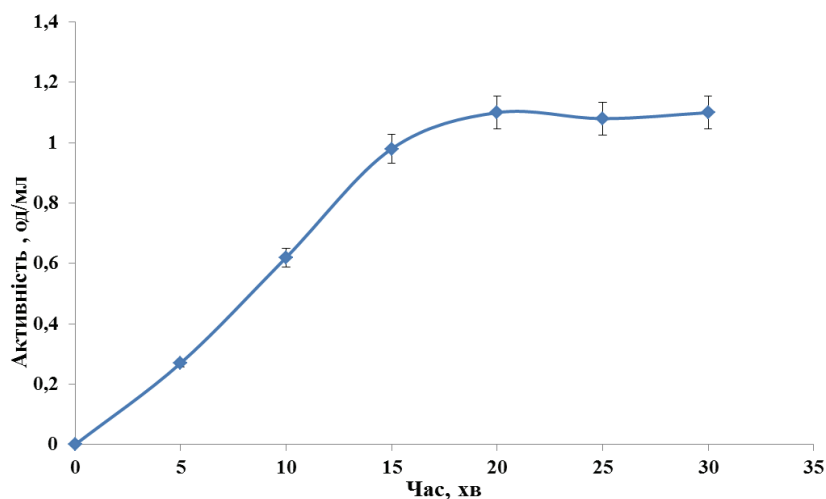


Рис. 3. Динаміка гідролізу синтетичного субстрату N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324

Fig. 3. Dynamic of the synthetic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa hydrolysis by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase

На цьому субстраті були визначені кінетичні параметри реакції: K_m (0,83 мМ) і V_{max} (20,1 ммоль·мл⁻¹·хв⁻¹) (рис. 4).

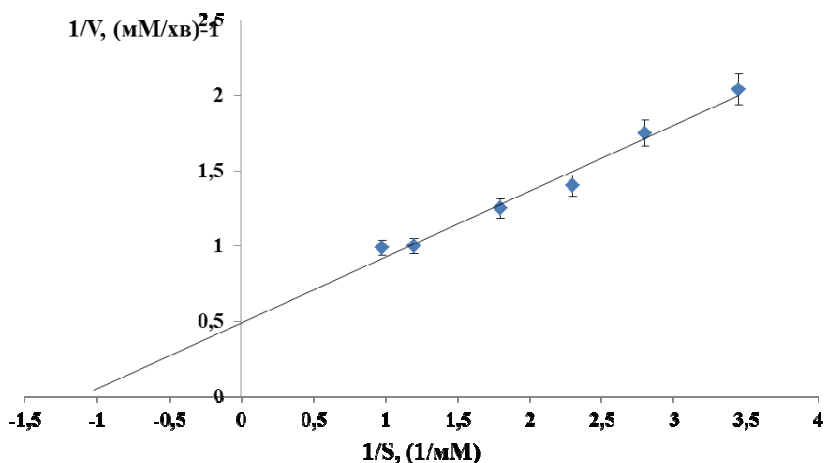


Рис. 4. Залежність швидкості гідролізу синтетичного субстрату N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa еластазою *B. thuringiensis* IMV B-7324 від концентрації субстрату в обернених координатах Лайнуївера-Берка

Fig. 4. The concentration dependence of the synthetic substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa hydrolysis rate by *B. thuringiensis* IMV B-7324 elastase in Lineweaver-Burke reciprocal coordinates

Оскільки застосування синтетичних субстратів для визначення активності є універсальним і легко відтворюваним методом, то кінетичні параметри гідролізу цих субстратів можна порівнювати з такими ж, отриманими для інших ензимів подібної специфічності. Використовуючи дані бази даних BRENDA, було показано, що константа Міхаеліса, яка визначає ступінь спорідненості ензиму до субстрата, виділеної еластази *B. thuringiensis* знаходиться на рівні значень панкреатичної еластази і є в 5 разів нижчою за K_m для цього субстрату протеїнази К, яка також проявляє еластазоподібну активність (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння констант Міхаеліса еластолітичних пептидаз різного походження

Table 2

Comparison of the elastolytic peptidases Michaelis constants of different origin

Пептидаза	K_m , мМ
Еластаза <i>Bacillus thuringiensis</i> IMV B-7324	0,83
Протеїназа К <i>Engyodontium album</i> (EC 3.4.21.64) [14]	4,23*
Аквалізін 1 <i>Thermus aquaticus</i> (EC 3.4.21.111) [15]	1,3*
Панкреатична еластаза (EC 3.4.21.36) [6]	0,68*
Лейкоцитарна еластаза (EC 3.4.21.37) [12]	3,7*

Примітка: * – дані бази даних <http://www.brenda-enzymes.org/>

Note: * – data of data base <http://www.brenda-enzymes.org/>



Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що еластолітична пептидаза *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гідролізує широкий спектр нативних білків фібрилярної і глобулярної природи, що зумовлено її специфічністю щодо залишків гідрофобних амінокислот – аланіну, лейцину, фенілаланіну. Показано, що еластаза має субстратну специфічність, подібну до пептидаз субтилізинового типу, що визначається здатністю гідролізувати специфічні хромогенні субстрати Z-Ala-Ala-Leu-pNa і Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а також має естеразну активність. Кінетичні параметри реакції гідролізу специфічного субстрату еластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa складають 0,83 мМ (K_m) і 20,1 ммоль·мл⁻¹·хв⁻¹ (V_{max}) і знаходяться на рівні значень панкреатичної еластази, що робить виділений ензим перспективним для практичного застосування.

Е.В. Мацелюх

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев
ГСП, Д03680, Украина, тел.: +38(044) 526 23 39,
e-mail: oivanko@yahoo.com

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СЕРИНОВОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ПЕТИДАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* ІМВ В-7324

Реферат

Цель. Исследование субстратной специфичности сериновой щелочной пептидазы *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324. **Методы.** Для изучения субстратной специфичности использовали белки: казеин, эластин, фибрин, фибриноген, коллаген. Определение первичной субстратной специфичности проводили, используя синтетические хромогенные субстраты. Максимальную скорость (V_{max}) и константу Михаэлиса (K_m) определяли по методу Лайнуивера-Берка из кривой зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенной с помощью метода двойных обратных величин в координатах ($1/V-1/[S]$). **Результаты.** Показано, что энзим обладает субстратной специфичностью, подобной пептидазам субтилизинного типа, что определяется способностью гидролизировать специфические хромогенные субстраты Z-Ala-Ala-Leu-pNa и Z-Gly-Gly-Phe-pNa, а также проявляет эстеразную активность. Кинетические параметры реакции гидролиза специфического субстрата эластаз N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa составляют 0,83 мМ (K_m) и 20,1 ммоль·мл⁻¹·мин⁻¹ (V_{max}). **Выводы.** Способность эластолитической пептидазы *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 гидролизировать широкий спектр нативных белков фибриллярной и глобулярной природы обусловлена ее специфичностью к остаткам гидрофобных аминокислот – аланина, лейцина, фенилаланина. По кинетическим параметрам энзим не уступает панкреатической эластазе и является перспективным для практического применения.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, эластаза, субстратная специфичность, синтетические субстраты.



O.V. Matseliukh

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38(044) 526 23 39, e-mail: oivanko@yahoo.com

SUBSTRATE SPECIFICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324 SERINE ALKALINE PEPTIDASE

Summary

Aim. Investigation of substrate specificity of serine alkaline protease from *Bacillus thuringiensis* IMV B- 324. **Methods.** To study the substrate specificity of the proteins there were used: casein, elastin, fibrin, fibrinogen and collagen. Determination of the primary substrate specificity was carried out using synthetic chromogenic substrates. The maximal velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were determined according to the method of Lineweaver-Burk using the curve of dependence of the reaction rate from substrate concentration in double reciprocal coordinates ($1/V-1/[S]$). **Results.** It was demonstrated that enzyme has substrate specificity similar to subtilisin-type proteases that was determined from the ability to hydrolyze specific chromogenic substrate Z-Ala-Ala-Leu-pNa i Z-Gly-Gly-Phe-pNa, and it also exhibited the esterase activity. Kinetic parameters of hydrolysis of the specific elastase substrate N-succinyl-Ala-Ala-Ala-pNa are 0.83 mM (K_m) and 20.1 mmol·mL⁻¹·min⁻¹ (V_{max}). **Conclusions.** The ability of elastolytic peptidase *B. thuringiensis* IMV B- 7324 to hydrolyse a wide range of native fibrillar and globular proteins is caused by its specificity to the hydrophobic amino acid residues – alanine, leucine, phenylalanine. Kinetic parameters of the enzyme are the same to pancreatic elastase. Thus enzyme is perspective for practical applications.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, elastase, substrate specificity, synthetic substrates.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Еремеев Н.Л., Карякин А.А., Казанская Н.Ф. Кинетика растворения твердых белковых субстратов протеиназами. Выбор механизма реакции // Биохимия. – 1989. – т. 54, вып. 3. – С. 503–510.
2. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанец Л.Д. Еластолітичні ензими мікроорганізмів // Біотехнологія. – 2010. – 3, № 4. – С. 20–28.
3. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанец Л.Д. Очистка і фізико-хімічні властивості пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 з еластазною і фібринолітичною активністю // Укр. біох. журн. – 2012. – 84, № 6. – С. 25–36.
4. Нідялкова Н.А. Пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 зі специфічністю до еластину і фібрину: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ. 2013. – 22 с.
5. Петрова И.С., Винцюняйте М.Н. Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиол. – 1966. – 2, № 1. – С. 322–327.



6. *Erlendsson L.S., Filippsusson H.* Purification and characterization of bovine pancreatic elastase // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1998. – В 120. – P. 549–557.
7. *Ferreira G.A., Magliano A.C., Pral E.M., Alfieri S.C.* Elastase secretion in *Acanthamoeba polyphaga* // *Acta Trop.* – 2009. – 112, N 2. – P. 156–163.
8. *Hedstrom L.* Serine protease. Mechanism and specificity // *Chem. Rev.* – 2002. – 102. – P. 4501–4523.
9. *Kristjansson M.M.* Activity measurements of proteinases using synthetic substrates // *Current Protocols in Food Analytical Chemistry.* – 2001. – C2.1.1–C2.1.7.
10. *Mandl I., Zipper H., Ferguson L.T.* Clostridium histolyticum collagenase: its purification and properties // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1958. – 74. – P. 465–475.
11. *Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // *Food style.* – 2004. – 8, № 1. – P. 92–95.
12. *Nakajima K., Powers J.C., Ashe B.M., Zimmerman M.* Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. Studies with peptide substrates related to the alpha 1-protease inhibitor reactive site // *J. Biol. Chem.* – 1979. – 254. – P. 4027–4032.
13. *Oleksy A., Golonka E., Bańbula A., Szmyd G., Moon J., Kubica M., Greenbaum D., Bogyo M., Foster T.J., Travis J., Potempa J.* Growth phase-dependent production of a cell wall-associated elastinolytic cysteine proteinase by *Staphylococcus epidermidis* // *Biol. Chem.* – 2004. – 385, N 6. – P. 525–535.
14. *Slovakova M., Peyrin J.M., Bilkova Z., Juklickova M., Hernychova L., Viovy J.L.* Magnetic proteinase K reactor as a new tool for reproducible limited protein digestion // *Bioconjugate Chem.* – 2008. – 19. – P. 966–972.
15. *Tanaka T., Matsuzawa H., Ohta T.* Substrate specificity of aqualysin I altered by an organic solvent // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1999. – 63. – P. 446–448.
16. *Trombridg G.O., Moon H.D.* Purification of human elastase // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1972. – 141, № 3. – P. 928–931.
17. *Zhao H.L., Chen X.L., Xie B.B., Zhou M.Y., Gao X., Zhang X.Y., Zhou B.C., Weiss A.S., Zhang Y.Z.* Elastolytic mechanism of a novel **M23 metalloprotease pseudoaltein** from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. CF6-2: Cleaving not only glycol bonds in the hydrophobic regions but also peptide bonds in the hydrophilic regions involved in cross-linking // *J. Biol. Chem.* – 2012. – 287. – P. 39710–39720.

Стаття надійшла до редакції 23.05.2014 р.



K.S. Ogirchuk, N.K. Kovalenko, O.A. Poltavska

Institute of Microbiology and Virology after D.K. Zabolotny NASU,
154, Zabolotny str., Kyiv, SMEs, D03680, Ukraine, tel.: +38(066)056 21 39
e-mail: ekaterina.kiev@gmail.com.

OPTIMIZATION OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS 55 CULTIVATION IN A MEDIUM WITH SODIUM SELENITE

Aim. Optimization of culture conditions of the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* 55 in the medium with sodium selenite. **Methods.** Studies of the influence of sodium selenite, inoculum size and cultivation time on the concentration of viable cells of *L. acidophilus* 55 were performed using a three-level factorial experiment on Box-Behnken (BBD). **Results.** It has been found that the inoculum size is the factor that has the greatest effect on the concentration of viable cells. The optimum conditions to maximize the concentration of viable cells in the presence of selenium ions were: the content of sodium selenite in the medium of 8.3%, the amount of inoculum 5.3% and 18 hours of cultivation time. **Conclusions.** When *L. acidophilus* 55 was cultured at optimized conditions, the highest concentration of viable cells was 2.5×10^8 CFU/ml.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, sodium selenite, optimization.

Selenium (Se) has received considerable attention as an essential micronutrient. Biological functions of selenium in the organism are mediated by a variety of seleno-proteins (iodotrin 5'-deiodinase, glutathione peroxidase, etc.) as the enzymes involved in key biological processes, such as the AOD, thyroid function, bone formation, immunity, maintaining of reproductive health and others [3, 7, 11]. In this regard, currently, the addition of selenium in the diet becomes very popular. Nutritional supplements based on organic selenium compounds that are safer and more bioavailable than its inorganic forms have received the highest recognition [3]. Various selenium-enriched biological products, including yeast, eggs, meat, wheat, fruits and vegetables have been developed [6, 8, 9, 12, 13].

At the same time, the effect of selenium on the representatives of the normal intestinal microbiota has hardly been studied. So, Calomme M.R. *et al* [4] first showed that different types of lactobacilli can accumulate Se in biomass comprising intracellular selenocysteine and are a potential source of organic selenium. There are few informations about selenium biotransformation ability of such species of lactic acid bacteria (LAB) as: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. casei subsp. casei*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* [1, 2, 4, 14]. Similar data on *Lactobacillus acidophilus*, which is one of the most common types of lactobacilli – representatives of normobiota of gastrointestinal tract of humans, are absent. Such studies are actual and have the prospects of use in medicine and food industry.

The purpose of this study was to determine the optimal conditions of cultivation of *L. acidophilus* strain 55 in the medium with sodium selenite, using statistical methods of multifactorial experiment planning (Box-Behnken).

© K.S. Ogirchuk, N.K. Kovalenko, O.A. Poltavska, 2014



Materials and Methods

The object of the study was active strain *Lactobacillus acidophilus* 55, isolated from human intestine. Cultivation of the strain was carried out on MRS medium at 37 °C.

To determine the tolerance to lactic acid bacteria to Se^{4+} , overnight culture of the test strain has been cultured in 50 ml vials, on MRS medium supplemented with sodium selenite (Na_2SeO_3). Na_2SeO_3 solution in sterile distilled water was added to the sterile culture medium to the final concentration of sodium selenite 1; 2; 3; 4; 6; 8; 20; 26 mg/l [4, 5].

Input data to determine the optimal parameters of growth was determined by cultivating the lactobacilli in 200 ml flasks containing 50 ml of MRS, supplemented with sodium selenite at final concentration 1; 8 or 16 mg/l in the medium. The medium was inoculated with 18-hour culture of lactobacilli grown in MRS and standardized to 1.5×10^8 CFU/ml. The inoculum was added into the flasks with the medium in the amount of 3, 5 or 8%. The results have been processed by counting the colony forming units (CFU) of *Lactobacillus* grown on solid MRS medium after 48 hours of growth.

Dependence of the concentration of viable cells *L. acidophilus* 55 (Y) from the concentration of sodium selenite in the culture medium (X_1), inoculum size (X_2) and fermentation time (X_3) was assessed using regression analysis methods in the theory of experiment planning on Box-Behnken [10]. This approach allows in the frame of the same model to estimate the linear and quadratic effects of influence of factors (X_1 , X_2 and X_3) on optimization index (Y) and express it as a regression equation:

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j < i} a_{ij} x_i x_j .$$

were a_0 – constant, a_i – linear coefficient, a_{ii} – quadratic coefficient, a_{ij} – interactive coefficient.

The statistical data processing (calculation of the regression coefficients, regression analysis of variance ANOVA and the construction of response surfaces) was conducted by using the program Statistica 6.0 (StatSoft Ink., 2002). The obtained coefficients were considered as statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results and Discussions

At the beginning of the study the ability of the strain *Lactobacillus acidophilus* 55 to grow on the medium containing various concentrations of selenite ions has been determined. The ability to accumulate biomass and active acidity of the medium at the end of cultivation were the main parameters characterizing the tolerance of lactobacilli to Se^{4+} . The evaluation of the influence of sodium selenite in a wide concentration range (1–26 mg/l) on the growth of the culture showed that the presence of sodium selenite in the medium at concentrations of 1, 4, 6 and 8 mg/l does not significantly affect the growth of the culture. At the concentrations of 2 and 3 mg/l weaker stimulating effect was observed (Fig. 1), while higher concentrations (20 and 26 mg/l) inhibited the accumulation of lactic acid bacteria biomass.



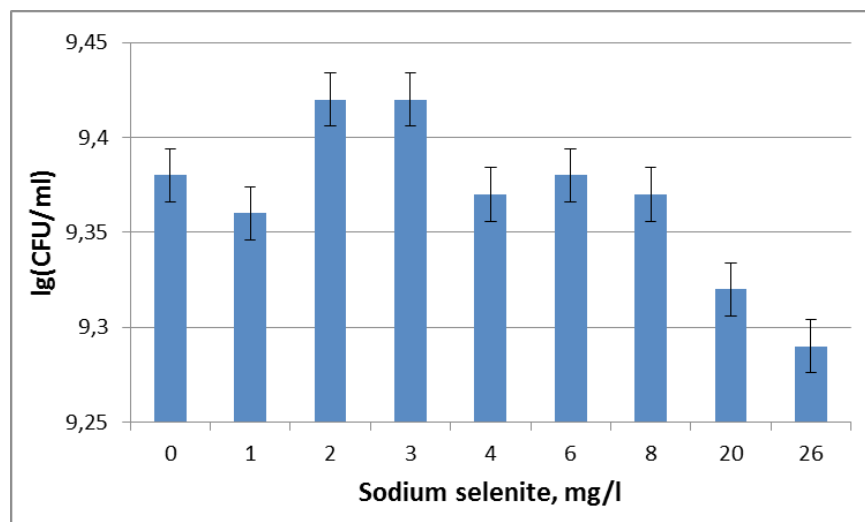


Fig. 1. Biomass accumulation by *L. acidophilus* 55 strain in the medium with varying concentrations of sodium selenite

The intensity of acid formation by culture of *L. acidophilus* 55 decreased in the presence of sodium selenite at the concentrations of 20 and 26 mg/l and after 24 hours of growth the pH of the culture medium was detected within 4.0–4.5 (Fig. 2). For other concentrations of sodium selenite studied pH of the culture medium was reduced to 3.5.

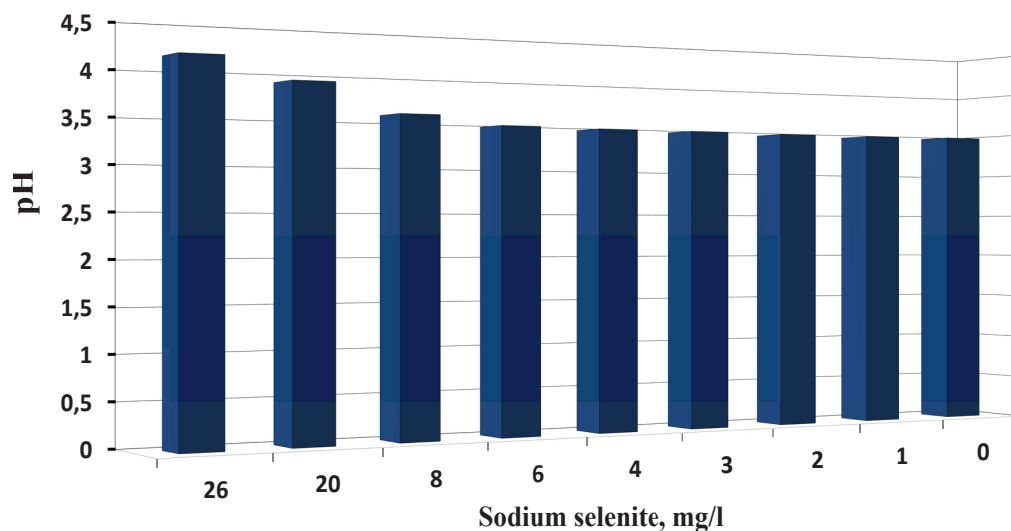


Fig. 2. The pH of the culture medium *L. acidophilus* 55 in the medium with varying concentrations of sodium selenite



Thus, the concentrations of selenium 20 and 26 mg/l were excluded from further analysis because they suppressed the growth of lactic acid bacteria and acid production.

In the further investigation *in silico* optimization of the parameters of cultivation of *L. acidophilus* 55 in the presence of various concentrations of sodium selenite (1–16 mg/l) was carried out. The investigations were carried out on Box-Behnken (Table 1). The design of experiment, as well as the variants of factor combinations and the results obtained are shown in Table 2.

Table 1

Optimization factors and their values used in Box-Behnken design

Factors	Factor levels, coded values		
	-1	0	+1
Sodium selenite concentration (X_1), mg/l	1	8	16
Inoculum size (X_2), %	3	5	8
Fermentation time (X_3), hour	6	18	30

Table 2

Planning matrix of the experiment of Box-Behnken design

№	Factors			Parameter optimization
	X_1	X_2	X_3	lgCFU/ml
1	1	3	18	9.10
2	16	3	18	7.84
3	1	8	18	7.48
4	16	8	18	7.57
5	1	5	6	7.74
6	16	5	6	7.72
7	1	5	30	7.60
8	16	5	30	7.60
9	8	3	6	7.74
10	8	8	6	7.84
11	8	3	30	7.48
12	8	8	30	7.00
13-15	8	5	18	7.68 ± 0.075

Note: X_1 – Sodium selenite concentration, mg/l,

X_2 – inoculum size, %,

X_3 – fermentation time, hour



The level of significance of the effects (linear, quadratic and interaction effects) was determined by the analysis of variance (ANOVA), which showed that each of the optimization factors studied (concentration of sodium selenite (X_1), inoculum size (X_2) and the fermentation time (X_3)) had significant ($p \leq 0,05$) influence on the concentration of viable cells of lactic acid bacteria (Table 3).

Table 3

Results of ANOVA of depending of CFU of *Lactobacillus acidophilus* 55 from the factors and their interaction ***

Factors	Sum of squares	Degree of freedom	Average amount	F	p
(1) Sodium selenite, mg/l (L)*	0.22	1	0.22	38.5	0.03
Sodium selenite, mg/l (Q)**	0.15	1	0.15	26.2	0.04
(2) inoculum size, % (L)	0.83	1	0.83	146.9	0.01
(3) Time, hour (L)	0.17	1	0.17	29.4	0.03
Time, hour (Q)	0.33	1	0.33	57.8	0.02
1L by 2L	0.46	1	0.46	80.9	0.01
1L by 2Q	0.25	1	0.25	43.9	0.02
1Q by 2L	0.32	1	0.32	56.7	0.02
Error	0.01	2	0.01		
Total sum of squares	2.63	14			

*L – linear effects,

**Q – quadratic effects,

«by» – designation of the combined effect of several factors.

*** Factors and options combined action of factors that do not have significant influence on the estimated figure excluded from the analysis and are not presented in the table.

For visual assessment of the effects of ANOVA the Pareto chart, on which the effects are located according to absolute value descending has been shown in Fig. 3. This diagram shows that the linear effect of the amount of inoculum has the highest reliable influence, and the quadratic effect of concentration of sodium selenite has the lowest reliable influence.

During the analysis of raw data the regression equation has been obtained, which has the form of a quadratic polynomial of the second order, taking into account only statistically significant effects:

$$Y = 11,56 - 0,57 X_1 - 1,27 X_2 + 0,10 X_3 + 0,01 X_1^2 - 0,002 X_3^2 + 0,15 X_1 X_2 - 0,01 X_1 X_2^2 - 0,003 X_1^2 X_2$$



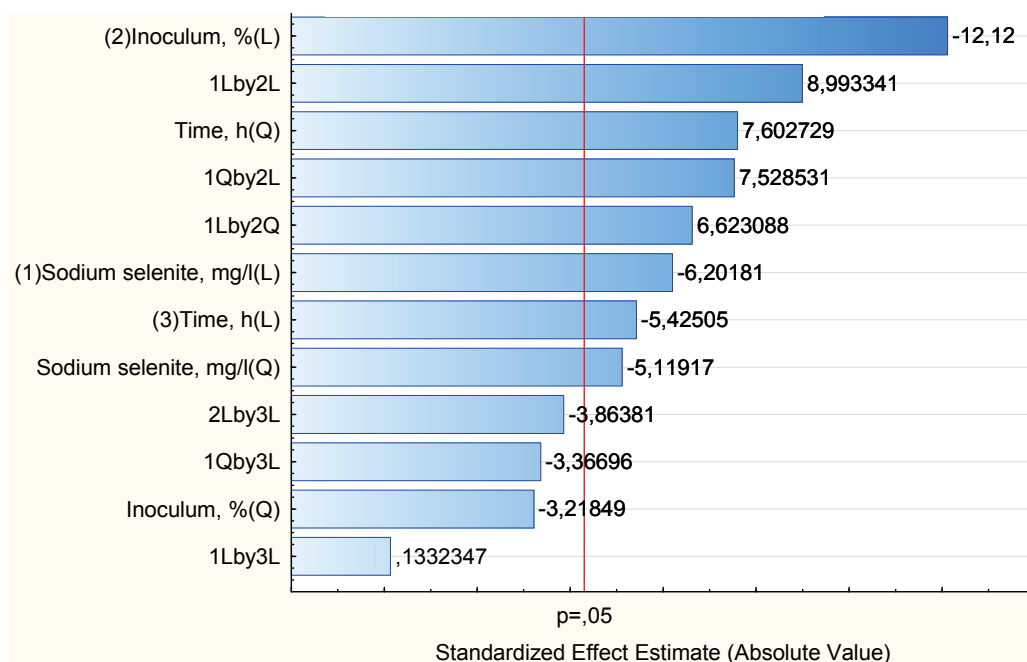


Fig. 3. Optimization factors influence on the concentration of viable cell *Lactobacillus acidophilus* 55

According to the resulting model contributed amount of inoculum was the most important factor ($F = 146.9$, $p \leq 0.01$), with the increase of which the concentration of viable cells of lactobacilli should decrease linearly. Likewise, increase of the concentration of sodium selenite, with constant other factors, should reduce the concentration of viable cells. At the same time, the coordinated increase in both factors will lead to the increase in the concentration of viable cells, which clearly indicate the need to maintain the balance between the concentration of inoculum and sodium selenite in the culture medium. Probably, such need arises from the fact that a large number of inoculum contributes to the rapid acidification of the culture medium, which leads to the destruction of bacteria. At the same time the positive effect of the interaction between these two factors can be explained by the decrease of toxic effects of inorganic selenium by lowering its concentration in the medium in terms of one CFU of lactobacilli at inoculation of large amounts of inoculum.

According to the response surface of concentration of viable cells of culture *L. acidophilus* 55 (Fig. 4), sodium selenite itself has a certain effect, inhibiting the growth of lactobacilli and the maximum concentration of viable cells will be achieved in the absence of sodium selenite in the culture medium. However, if the culture medium still contains sodium selenite, to obtain the maximum concentration of viable cells strict concentration ratio “sodium selenite concentration: inoculum: cultivation time” is needed.

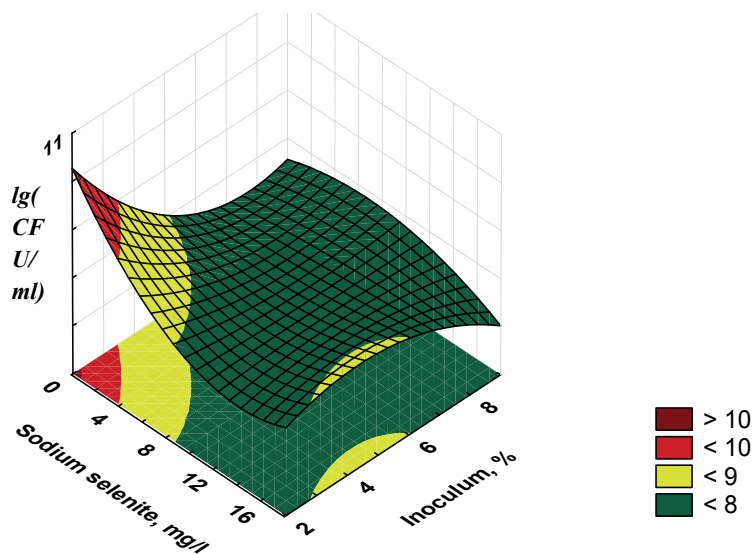


Fig. 4. Response surface concentration of viable cells *Lactobacillus acidophilus* 55 as a function of the inoculum size and the concentration of sodium selenite for fixed time of 18 h of fermentation

Assessing the effect of the concentration of the inoculum and sodium selenite on the concentration of viable cells, the cultivation time was an important factor ($F = 57.8, p \leq 0.02$) as well, indicating that the greatest effect on the interaction of factors studied is achieved after brief cultivation (6–18 h), and after definite time period (after 18 h), the concentration of viable cells will decline sharply (Fig. 5).

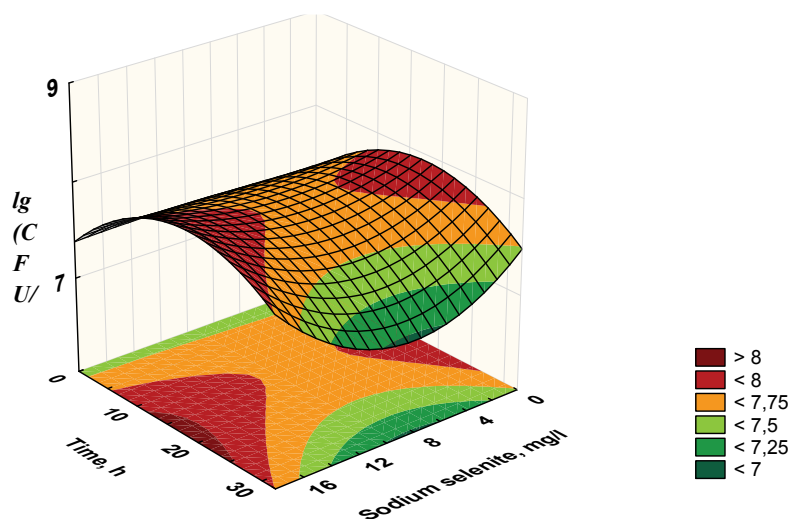


Fig. 5. Response surface concentration of viable cells as a function of culture time and the concentration of sodium selenite at fixed value by the average inoculum size level

The optimal design values for the studied factors were: sodium selenite 8.3 mg/l at 5.3% inoculum at 18 h of cultivation (Fig. 6). Deviations from the calculated data invariably leads to reduction in the titer of viable cells.

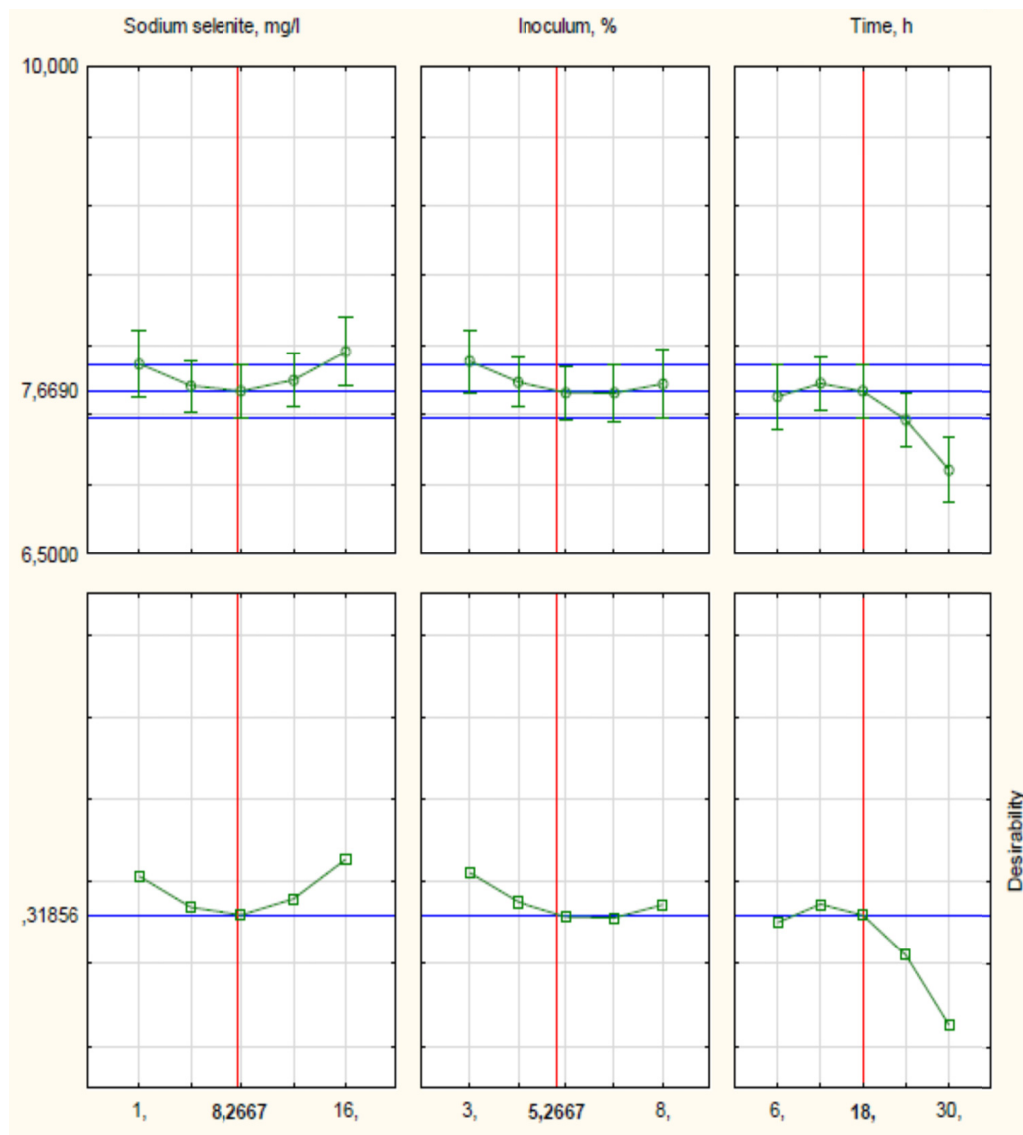


Fig.6. Profiles of the predicted values for the optimal concentration of viable cells of *Lactobacillus acidophilus 55*

To confirm the calculated data, concentrations of viable cell of *L. acidophilus 55* at cultivation in the medium with 4, 8 and 64 mg/l of sodium selenite at 5% inoculum within 18 hours (Fig. 7) has been determined. It is shown that in the presence of 8 mg/l sodium selenite concentration of viable cells of *L. acidophilus 55* is 17%

higher than when cultivated with 64 mg/l but 4% lower than in the medium without selenite. These results confirm the results of a visual analysis of the response surface of concentration of viable cells of *Lactobacillus acidophilus* 55 (Fig. 4)

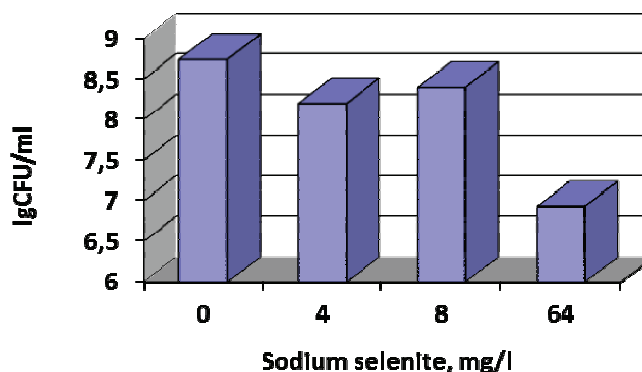


Fig.7. Concentration of viable cells *L. acidophilus* 55 under optimized conditions of culturing in the medium with varying concentrations of sodium selenite

The given result of the work showed that the optimal concentration of viable cells (2.5×10^8 CFU/ml) can be prepared by culturing *L. acidophilus* 55 for 18 h in the presence of 8 mg/l sodium selenite, when making a 5% inoculum.

К.С. Огірчук, Н.К. Коваленко, О.А. Полтавская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина, тел.: +38(066)056 21 39,
e-mail: ekaterina.kiev@gmail.com

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* 55 В СРЕДЕ С СЕЛЕНИТОМ НАТРИЯ

Реферат

Цель. Оптимизация условий культивирования пробиотического штамма *Lactobacillus acidophilus* 55 в среде с селенитом натрия. **Методы.** Изучение влияния селенита натрия, количества вносимого инокулюма и времени культивирования на концентрацию жизнеспособных клеток *L. acidophilus* 55 проводили с применением трехуровневого факторного эксперимента по плану Бокса-Бенкена (BBD). **Результаты.** Установлено, что количество инокулята является фактором, который оказывал наибольшее влияние на концентрацию жизнеспособных клеток. Оптимальными условиями для получения максимальной концентрации жизнеспособных клеток в присутствии ионов селена были: содержание селенита натрия в среде 8,3%, количество вносимого инокулюма 5,3% и время культивирования 18 ч. **Выводы.** При культивировании *L. acidophilus* 55 в оптимизированных условиях, максимальная концентрация жизнеспособных клеток составила $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, селенит натрия, оптимизация.



К.С. Огірчук, Н.К. Коваленко, О.А. Полтавська

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д03680, Україна, тел.: +38(066)056 21 39,
e-mail:ekaterina.kiev@gmail.com

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* 55 В СЕРЕДОВИЩІ З СЕЛЕНІТОМ НАТРІЮ

Реферат

Мета. Оптимізація умов культивування пробіотичного штаму *Lactobacillus acidophilus* 55 в середовищі з селенітом натрію. **Методи.** Вивчення впливу селеніту натрію, кількості інокулюму, що вноситься і часу культивування на концентрацію життєздатних клітин *L. acidophilus* 55 здійснювали з застосуванням трьохрівневого факторного експерименту за планом Бокса-Бенкена (BBD). **Результати.** Встановлено, що кількість інокуляту є фактором, який виявляв найбільший вплив на концентрацію життєздатних клітин. Оптимальними умовами для отримання максимальної концентрації життєздатних клітин за присутності іонів селену були: вміст селеніту натрію в середовищі 8,3%, кількість інокулюму, що вноситься 5,3% та час культивування 18 годин. **Висновки.** При культивуванні *L. acidophilus* 55 в оптимізованих умовах, максимальна концентрація життєздатних клітин становила $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Ключові слова: *Lactobacillus acidophilus*, селеніт натрію, оптимізація.

REFERENCES

1. Alzate A., Fernandez-Fernandez A., Perez-Conde M. C., Gutierrez A. M. et al. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir // J. Agric. Food Chem. – 2008. – 56. – P. 8728–8736.
2. Andreoni V., Moro Luischi M., Cavalca L., Erba D., Iappellano S. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species // Ann. Microbiol. – 2000. – 50. – P. 77–88.
3. Biminger M., Pilawa S., Flohe L. Trends in selenium biochemistry // Nat. Prod. Rep. – 2002. – 19. – P. 693–718.
4. Calomme M.R., Van den Branden K., Vanden Berghe D.A. Selenium and *Lactobacillus* species // J. Appl. Bacteriol. – 1995. – 79. – P. 331–340.
5. Calomme M.R., Van den Branden K., Vanden Berghe D.A. Seleno-lactobacillus: An organic selenium source // Biol. Trace Element Res. – 1995. – 47. – P. 379–384.
6. Carvalho K.M., Gallardo-Williams M.T., Benson R.F., Martin D.F. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops // J. Agric. Food Chem. – 2003. – 51. – P. 704–709.



7. Ebert R., Jakob F. Selenium deficiency as a putative risk factor for osteoporosis // International Congress Series 1297. – 2007. – P. 158–164.
8. Fisinin V.I., Papazyan T.T., Surai P.E. Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population // Crit. Rev. Biotechnol. – 2009. – 29. – P. 18–28.
9. Lintschinger J., Fuchs N., Moser J., Kuehnelt D., Goessler W. Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets // J. Agric. Food Chem. – 2000. – 48. – P. 5362–5368.
10. Palaniraj R., Nagarajan P. Statistical Analysis of Experimental Variables for the Production of Lactic acid using *Lactobacillus casei* from Waste Potato Starch by Box-Behnken Design // Int. J. Chem. Tech. Res. – 2012. – 4, № 3. – P. 1049–1064.
11. Schrauzer G.N. Anticarcinogenic effects of selenium // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2000. – 57. – P. 1864–1873.
12. Suhajda A., Hegoczki J., Janzso B., Pais I., Vereczkey G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of seleniumenriched *Saccharomyces cerevisiae* // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2000. – 14. – P. 43–47.
13. Turakainen M., Hartikainen H., Seppanen M.M. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum L.*) growth and concentrations of soluble sugars and starch // J. Agric. Food Chem. – 2004. – 52. – P. 5378–5382.
14. Xia S.K., Chen L., Liang J.Q. Enriched Selenium and Its Effects on Growth and Biochemical Composition in *Lactobacillus bulgaricus* // J. Agric. Food Chem. – 2007. – 55. – P. 2413–2417.

Стаття надійшла до редакції 25.12.2013 р.



О.В. Басюл, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: hbasuil@onu.edu.ua

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ — ПРЕДСТАВНИКІВ РЕЗИДЕНТНОЇ МІКРОБІОТИ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ

Метою дослідження було виділення штамів лактобактерій зі свіжих та самоквасних плодових тіл гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* та вивчення їхніх біологічних і біотехнологічних властивостей. *Методи.* Об'єктом дослідження були 50 штамів лактобактерій, виділених зі свіжих і самоквасних плодових тіл грибів глива звичайна *Pleurotus ostreatus*. Родову та видову належність лактобактерій встановлювали за морфолого-культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями, та підтверджували методом ПЦР з використанням праймерів до ділянок 16S РНК та *recA*. Ступінь кислотоутворення штамів лактобацил досліджували за інкубації у знежиреному молоці упродовж 1, 15 та 24 годин, граничну кислотність — за інкубації упродовж тижня, молочну кислоту — титрометричним методом. Антагоністичну активність лактобактерій визначали методом агарових блоків. *Результати.* Встановлено, що молочнокислі бактерії входять до складу мікробіоти плодових тіл гриба *Pleurotus ostreatus*. Ізольовані із свіжих та ферментованих грибів 8 штамів лактобактерій за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками віднесено до виду *Lactobacillus plantarum*, що підтверджено методом ПЛР. Досліджувані штами лактобацил за 15 год. продукують від $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочної кислоти, а гранична кислотність складає $144\text{--}300^\circ\text{T}$. *Висновок.* Штам *Lactobacillus plantarum* ONU315, ізольований з плодових тіл гливи звичайної є активним кислотоутворювачем з антагоністичною активністю високого та середнього ступенів щодо умовно патогенних бактерій, бактерій представників мікробіоти гливи, не проявляє антагонізму до молочнокислих бактерій інших видів.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність, молочна кислота, глива звичайна, ферментування.

Вибір бактерій роду *Lactobacillus* у якості заквашувальних культур для виробництва ферментованих продуктів харчування обумовлений здатністю лактобактерій перешкоджати розмноженню патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, підвищувати імунорезистентність макроорганізму та приналежністю їх до категорії безпечних мікроорганізмів (GRAS) [11].

Глива звичайна є цінним джерелом екологічно чистої харчової сировини, низькокалорійним продуктом, що швидко псується та потребує переробки, найбільш ефективним способом якої є ферментування [5]. На плодових тілах гливи виявлено бактерій родів *Bacillus*, *Planococcus*, *Sporosarcina* та *Lactobacil-*



lus [9]. Процес самосквашування здійснюється переважно молочнокислими бактеріями, що входять до складу мікробіоти плодових тіл, проте інформація про них практично відсутня.

Відсутність комерційних стартерних культур бактерій роду *Lactobacillus* з високими біотехнологічними показниками для ферментування грибів робить процес ферментації не прогнозованим, а кількість індигенних лактобактерій для домінування молочнокислого бродіння є недостатньою, внаслідок чого продукція втрачає безпечність, погіршуються її органолептичні властивості.

У зв'язку з цим метою дослідження було виділення штамів лактобактерій зі свіжих та самоквасних плодових тіл гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* та вивчення їхніх біологічних і біотехнологічних властивостей.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 50 штамів лактобактерій, виділених зі свіжих і самоквасних плодових тіл грибів глива звичайна *Pleurotus ostreatus*.

Лактобактерії виділяли шляхом висіву на агаризоване середовище MRS змивів з плодових тіл свіжої та некомерційної самоквасної гливи звичайної, культивували за температури 36 °С впродовж 2 діб та визначали приналежність до роду *Lactobacillus* за тінкторіальними, морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними ознаками: забарвленням за Грамом, формою та розміром клітин, рухливістю, наявністю каталази, здатністю відновлювати нітрати в нітрити та рости за температур 4–50 °С [8]. Видову приналежність бактерій роду *Lactobacillus* визначали за ферментацією спектру вуглеводів та цукроспиртів з використанням тест-системи Api 50 Chl Medium. Відношення до гомо- та гетероферментативних лактобактерій виявляли методом Gibson та Ab-el-Malek з використанням томатно-глюкозного агару [8].

Родову та видову приналежність лактобактерій підтверджували методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів (табл. 1) до ділянки 16S РНК, наявної у всіх видів роду *Lactobacillus* і до ділянки *recA*, притаманної для представників виду *Lactobacillus plantarum*.

ДНК бактерій виділяли методом теплового лізису бактеріальних клітин за модифікованою методикою Szegedi and Bottka [10, 12].

Ступінь кислотоутворення визначали за інкубації у знежиреному молоці упродовж 1, 15 та 24 годин, граничну кислотність – за інкубації упродовж тижня, молочну кислоту – титрометричним методом [1, 3].

Антагоністичну активність лактобактерій відносно умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів визначали методом агарових блоків [6]. Індикаторними мікроорганізмами були штами умовно патогенних бактерій та штами бактерій-представників мікробіоти, ізольовані нами з плодових тіл гливи.

Статистичну обробку результатів здійснювали шляхом розрахунку середніх значень показників (\bar{X}) та їх стандартної похибки ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Ст'юдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів за рівнем значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$).



Таблиця 1

Праймери до ділянок 16S РНК та *recA*

Table 1

Primers to 16S РНК and *recA* sites

Праймер	Послідовність	Розмір ампліконів, п.о.	Примітка
LbLMA-1	5'-СТС ААА АСТ ААА САА АГТ ТТС-3'	250	Спільний для бактерій роду <i>Lactobacillus</i>
R-161	5'-СТТ ГТА САС АСС GCC CGT ТСА-3'	250	
planF	5'-CCG ТТТ АТГ СGG ААС АСС ТА-3'	318	Специфічний для бактерій виду <i>L. plantarum</i>
pREV	5'-TCG GGA ТТА ССА ААС АТС АС-3'	318	

Результати та їх обговорення

З гливи звичайної було виділено 50 ізолятів молочнокислих бактерій, з яких для дослідження відібрано 8 штамів, які мали високу швидкість росту. Ізольовані штами лактобактерій представлені грампозитивними паличками правильної форми, з тенденцією до ланцюгоутворення, каталазонегативні і нездатні до відновлення нітратів, що дозволило віднести їх до роду *Lactobacillus*.

Встановлено, що відібрані штами лактобактерій утилізують L-арабінозу, D-галактозу, D-глюкозу, D та L-ксилозу, D-лактозу, D-маніт, D-рафінозу, D-сорбіт, D-фруктозу, D-целобіозу, D-цукрозу та не утилізують L-рамнозу. Усі культури не продукують газ із глюкози і ростуть за температури 15 °С. Ці ознаки характеризують їх як факультативно-гетероферментативні молочнокислі бактерії, що відносяться до виду *Lactobacillus plantarum*.

Як видно з таблиці 1, у результаті проведення ПЛР з ДНК виділених штамів бактерій з родоспецифічними праймерами LbLMA-1 та R-161 отримано амплікони розміром 250 п. о., що вказують на наявність ділянок 16S рРНК, характерних для бактерій роду *Lactobacillus*. Полімеразна ланцюгова реакція з видоспецифічними праймерами planF та pREV до ділянки гену *recA* підтвердила належність відібраних штамів до виду *Lactobacillus plantarum*, на що вказувала присутність ампліконів розміром 318 п. о.

Таким чином, встановлення генетичних послідовностей ДНК лактобактерій підтвердило родову та видову належність штамів, визначену за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. Електронно-мікроскопічні знімки деяких з досліджуваних штамів наведено на рис. 1.

Штам молочнокислих бактерій вважається активним і може застосовуватися для ферментації, якщо за 15 годин культивування на середовищі він утворює 0,5% молочної кислоти [3]. З огляду на це, було досліджено активність кислотоутворення ізольованих штамів лактобактерій.



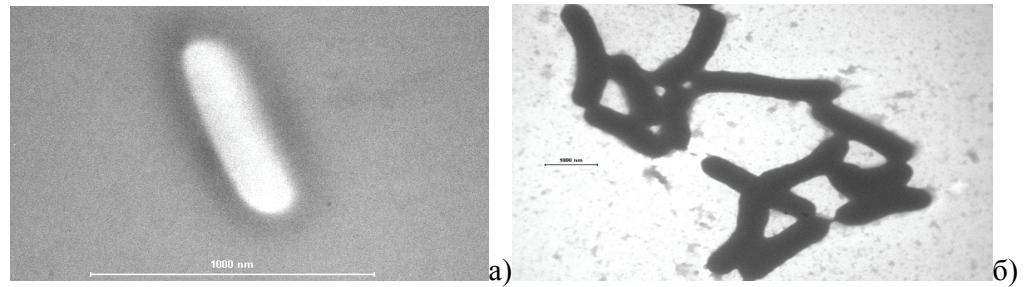


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні знімки молочнокислих бактерій

a) *Lactobacillus plantarum* ONU 314 (x11000);

b) *Lactobacillus plantarum* ONU 315 (x3800)

Fig. 1. Lactic acid bacteria electron microscopic images

a) *Lactobacillus plantarum* ONU 314 (x11000);

b) *Lactobacillus plantarum* ONU 315 (x3800)

Як видно з табл. 2 досліджувані штами лактобацил за 15 год продукують від $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочної кислоти.

Встановлено, що найбільше молочної кислоти за 15 годин культивування продукують бактерії штаму *L. plantarum* ONU 315 ($1,4 \pm 0,2\%$).

Найвищими показниками кислотоутворення за добу характеризувалися лактобактерії штамів *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315, відповідно $145 \pm 5,1$ °T і $170 \pm 4,2$ °T.

Відомо, що процес ферментації грибів триває залежно від умов ферментації до чотирьох тижнів і більше, при цьому рН знижується [4, 5]. Враховуючи це, доцільним було визначити показники граничної кислотності, що накопичується досліджуваними штамами лактобацил. Виявилось, що найвищими показниками граничної кислотності – $240 \pm 5,2$ і $300 \pm 9,1$ °T характеризувалися штами *L. plantarum* ONU 314 та *L. plantarum* ONU 315, відповідно, які були відібрані для подальших досліджень.

В подальшому встановлено, що досліджувані штами *L. plantarum* ONU 314 та *L. plantarum* ONU 315 ростуть за температур 4–50 °C і значень рН 3–7, що є важливим критерієм за відбору стартерних культур бактерій, оскільки дозволяє їхнє використання при широких діапазонах температур та кислотності середовища [7].

Відомо, що антимікробна активність лактобацил по відношенню до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів пояснюється продукцією органічних кислот, переважно молочної, перекису водню, антибіотиків, лізоциму та бактеріоцинів. Спектр сполук з антибактеріальною активністю, що утворюються лактобацилами, залежить від виду та штаму мікроорганізму, умов росту популяції. Штами з антибіотичною активністю, як правило, є одночасно і активними кислотоутворювачами [2, 7].

Таблиця 2

Показники кислотоутворення досліджуваних лактобактерій

Table 2

Studied lactobacilli lactic acid production indicators

Штам	Кислоти			Гранична кислотність, °Т
	органічні		молочна	
	°Т/1год	°Т/24 год	%/15 год	
<i>L. plantarum</i> ONU 314	40,5 ± 1,2	145,0 ± 5,1	1,0 ± 0,2	240,0 ± 5,2
<i>L. plantarum</i> ONU 315	50,7 ± 1,1 *	170,0 ± 4,2 *	1,4 ± 0,2 *	300,0 ± 9,1 *
<i>L. plantarum</i> ONU 316	38,5 ± 1,4	140,0 ± 4,5	0,7 ± 0,03	232,0 ± 6,7
<i>L. plantarum</i> ONU 411	36,2 ± 1,2	135,0 ± 5,3	0,7 ± 0,01	220,0 ± 5,5
<i>L. plantarum</i> ONU 412	32,0 ± 1,4	120,0 ± 5,3	0,6 ± 0,01	161,0 ± 4,7
<i>L. plantarum</i> ONU 413	31,4 ± 1,4	115,0 ± 7,3	0,5 ± 0,04	158,0 ± 4,4
<i>L. plantarum</i> ONU 414	30,2 ± 1,4	104,0 ± 5,4	0,5 ± 0,03	149,0 ± 4,7
<i>L. plantarum</i> ONU 415	30,0 ± 1,2	100,0 ± 9,6	0,5 ± 0,03	144,0 ± 4,8

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з іншими штамми.

Note: * – significant difference in compare with other strains.

У результаті проведеного дослідження встановлена антагоністична активність штамів *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315 по відношенню до умовно патогенних бактерій та ізольованих представників мікробіоти гливи звичайної (табл. 3).

Проведені дослідження показали, що нейтралізація рН культурального середовища карбонатом кальцію призводить до значного зниження антагоністичної активності досліджуваних штамів лактобактерій, що вказує на те, що антимікробний ефект їх в основному обумовлений дією молочної кислоти, і лише частково – метаболітами іншої природи.

У ході подальших досліджень показано, що штами лактобактерій *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315 не виявляють антагоністичної активності по відношенню до 60 штамів лактобацил з колекції культур мікроорганізмів ОНУ імені І.І. Мечникова, що належать до видів: *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii subs. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*.



Антагоністична активність досліджуваних лактобактерій

Studied lactobacilli antagonistic activity

Індикаторний мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту індикаторних мікроорганізмів, мм	
	<i>L. plantarum</i> ONU 314	<i>L. plantarum</i> ONU 315
<i>Micrococcus luteus</i> ONU 199	30,2 ± 1,4	32,1 ± 1,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ONU 211	24,1 ± 1,2	34,3 ± 1,1
<i>Escherichia coli</i> ONU 90	35,1 ± 1,3	34,2 ± 1,3
<i>Staphylococcus aureus</i> ONU 229	30,2 ± 1,4	32,1 ± 1,3
<i>Proteus vulgaris</i> ONU 91	25,3 ± 1,5	27,3 ± 1,4
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 431	28,4 ± 1,1	29,4 ± 1,0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ONU434	29,2 ± 1,3	29,3 ± 1,2
<i>Planococcus citreus</i> ONU 421	30,1 ± 1,2	31,2 ± 1,0
<i>Sporosarcina ureae</i> ONU 422	29,2 ± 1,1	30,1 ± 1,1
<i>Sporosarcina halophila</i> ONU 423	35,2 ± 1,1	36,3 ± 1,0

Примітка: діаметр зони затримки росту із врахуванням діаметру блоку (16 мм) < 23 мм – мікроорганізми малочутливі; 23–33 мм – чутливі; > 33 мм – високочутливі.

Note: stunted growth zone diameter, with block diameter (16 mm) <23 mm – tolerant microorganisms; 23–33 mm – sensitive; > 33 mm – highly sensitive.

Таким чином, встановлено, що молочнокислі бактерії входять до складу мікробіоти плодівих тіл *Pleurotus ostreatus*. Ізольовані із свіжих та ферментованих грибів 8 штамів лактобактерій за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками віднесено до виду *Lactobacillus plantarum*. За найвищими показниками кислотоутворювальної та антагоністичної активностей штам *L. plantarum* ONU 315 може бути перспективним для ферментування гливи звичайної, що забезпечить досягнення мікробіологічної безпеки, зберігання готового продукту тривалішим, а процес ферментації більш прогнозованим.



Е.В. Басюл, А.В. Ямборко, В.О. Иваныця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: helenbasiul@onu.edu.ua

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАКТЕРИЙ – ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РЕЗИДЕНТНОЙ МИКРОБИОТЫ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Реферат

Целью исследования было выделение штаммов лактобактерий из свежих и самоквасных плодовых тел вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* и изучение их биологических и биотехнологических свойств. **Методы.** Объектом исследования были 50 штаммов лактобактерий, выделенных из свежих и самоквасных плодовых тел вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus*. Родовую и видовую принадлежность лактобактерий устанавливали по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим свойствам, и подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров к участкам 16S PНК и *recA*. Степень кислотообразования штаммов лактобацилл исследовали при инкубации в обезжиренном молоке на протяжении 1, 15 и 24 часов, предельную кислотность – при инкубации на протяжении недели, молочную кислоту – титрометрическим методом. Антагонистическую активность лактобактерий определяли методом агаровых блоков. **Результаты.** Установлено, что молочнокислые бактерии входят в состав микробиоты плодовых тел гриба *Pleurotus ostreatus*. Выделенные со свежих и ферментированных грибов 8 штаммов лактобактерий по морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам отнесены к виду *Lactobacillus plantarum*, что подтверждено методом ПЦР. Исследуемые штаммы лактобацилл за 15 часов продуцируют от $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочной кислоты, а предельная кислотность составляет 144–300 °Т. **Вывод.** Штамм *Lactobacillus plantarum* ONU315, выделенный из плодовых тел вешенки обыкновенной является активным кислотообразователем с антагонистической активностью высокой и средней степени по отношению к условно патогенным бактериям, бактериям представителям микробиоты вешенки, не проявляет антагонизма к молочнокислым бактериям других видов.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонистическая активность, молочная кислота, вешенка обыкновенная, ферментация.



O.V. Basiul, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia

Odesa I.I. Mechnykov National University, 2, Dvorianska str, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: hbasiul@onu.edu.ua

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLI –
OYSTER MUSHROOM RESIDENTIAL MICROBIOTA
REPRESENTATIVES**

Summary

The **aim** of the investigation was lactobacilli strains isolation from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies and study of their biological and biotechnological properties. **Methods.** Investigation objects were 50 lactobacilli strains isolated from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies. Lactobacilli genus and species belonging were determined by morphological, cultural, physiological, biochemical properties and confirmed by PCR method with primers to *16S PHK* and *recA*. **Lactobacilli strains acid producing degree was investigated** by incubation in skimmed milk for 1, 15 and 24 hours, limit acidity – by week incubation, lactic acid percentage – by titration method. Lactobacilli antagonism was determined by agar blocks method. **Results.** Lactic acid bacteria are considered to be a part of *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies microbiota. 8 lactobacilli strains, isolated from fresh and fermented mushrooms, were identified by morphological, cultural and physiology-biochemical properties as the *Lactobacillus plantarum* species, that was confirmed by PCR method. Investigated lactobacilli strains produce from 0.5 ± 0.1 to $1.4 \pm 0.2\%$ of lactic acid for 15 hours, and acidity is 144–300 °T. **Conclusion.** Strain *L. plantarum* ONU315, isolated from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies, is active acid producer with high and medium level antagonistic activity to opportunistic bacteria, bacteria – oyster mushroom representatives, do not show antagonism to other species lactic acid bacteria.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, antagonistic activity, lactic acid, oyster mushroom, fermentation.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. ГОСТ 8764-73. Консервы молочные. Методы испытаний. – М.: Изд-во стандартов, 1983. – 31с.
2. Донцова Т.А., Швець Г.В., Іваниця В.О. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus* // Вісник Одеського держ. ун-ту. – О., 2000. – Т. 5. – 1. – С. 146–150.
3. Дышкантюк О. В. Биотехнология получения молочной кислоты и ее солей на основе продуктов вторичной переработки зерна: Автореф. дис. канд. техн. наук 03. 00. 20. – О, 2000. – 185 с.



4. Крайнюк Л.Н., Мячикова Н.И. Технология переработки культивируемых грибов вешенка обыкновенная в кулинарную продукцию длительного хранения // Материалы II Международной конференции «Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов». – Д., 2002. – 205 с.
5. Матюхина З.П., Королькова Э.П. Квашеные (соленые) овощи и грибы // Товароведение пищевых продуктов. – М., 2000. – С. 91–94.
6. Червинец Ю. В. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл // ЖМЭИ. – 2006. – № 7. – С. 78–82.
7. Aguilar A. Biotechnology of lactic acid bacteria: An European perspective // Food Biotechnology – 1991. – P. 323–330.
8. Axelsson L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology // In S. Salminen and A. Von Wright, Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993. – 21 p.
9. Basiul O.V. *Pleurotus ostreatus* residential microbiota and its role in mushrooms fermentation / Сборник тезисов Международная виртуальная интернет-конференция «Биотехнология. Взгляд в будущее». – Казань, 2012. – С. 306–310.
10. Dubernet S., Desmaures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – 10. – № 214 (2). – P. 271–275.
11. Kruger C., Hu Y., Pan Q. Single chain producing lactobacilli: a new tool for in situ delivery of passive immunity // Nature Biotechnology – 2002. – 20. – P. 702–706.
12. Torriani Sandra, Felis Giovanna E., Franco Dellaglio. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – 67. – № 8 – P. 3450–3454.

Стаття надійшла до редакції 01.06.2014 р.



I.V. Kushkevych

Institute of Animal Biology of NAAS of Ukraine,
38, Vasyl Stus St., Lviv 79034, Ukraine,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

ACTIVITY AND KINETIC PROPERTIES OF ADENOSINE 5'-PHOSPHOSULFATE REDUCTASE IN THE INTESTINAL SULFATE-REDUCING BACTERIA

*Adenosine 5'-phosphosulfate (APS) reductase activity and the kinetic properties of the enzyme from intestinal sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 has never been well-characterized and has not been studied yet. **The aim** and background of this work was to investigate the dissimilatory APS reductase activity in cell-free extract of intestinal sulfate-reducing bacteria *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 and to carry out the kinetic analysis of enzymatic reaction. **Methods.** Microbiological, biochemical, and biophysical methods of the studies, and statistical processing of the results were used; the obtained data were compared with those from literature. **Results.** Dissimilatory APS reductase activity in the sulfate-reducing bacteria isolated from human intestine was studied. The highest activity of the enzyme ($0.34 \pm 0.029 \text{ U} \times \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) was measured in the cell-free extract prepared from *D. piger* Vib-7 cells then from *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ($0.22 \pm 0.018 \text{ U} \times \text{mg}^{-1} \text{ protein}$). The optimal temperature ($+35 \text{ }^\circ\text{C}$) and pH (8.0) for APS reductase reaction were determined. The analysis of the kinetic properties of the bacterial APS reductase was carried out. The APS reductase activity, initial (instantaneous) reaction rate (V_0) and maximum rate of the APS reductase reaction (V_{max}) in both *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 bacterial strains were defined. Michaelis constants (K_m) of the enzyme reaction (4.33 ± 0.47 and $3.57 \pm 0.32 \text{ mM}$ for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively) were determined. **Conclusion.** The described results of these studies can be the prospects to clarify the etiological role of these bacteria in the development of inflammatory bowel diseases humans and animals.*

Key words: activity of APS reductase, kinetic analysis, sulfate-reducing bacteria, intestinal microbiocenosis, inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis.

Sulfate-reducing bacteria produce hydrogen sulfide in the intestine lumen in the process of dissimilatory sulfate reduction. This process includes many stages where many different enzymes are involved [2, 7]. One of these enzymes is adenosine 5'-phosphosulfate (APS) reductase catalyzing the two-electron reduction of APS to sulfite and AMP, and it is a key step in the sulfate assimilation pathway in sulfate-reducing bacteria [13]. The adenylation product, APS, is reduced to sulfite, which is then further reduced to sulfide [2, 7, 13]. This final metabolic product is carcinogenic



to intestinal epithelial cells, and can cause inhibition of cytochrome oxidase, colonocytes oxidation of butyrate, destruction of epithelial cells, development of ulcers and inflammation with subsequent development of colon cancer [4, 8].

As far as it is aware, dissimilatory APS reductase from intestinal sulfate-reducing bacteria *D. piger* and *Desulfomicrobium* has never been well-characterized and has not been studied. In literature, there are some data about APS reductase of the sulfate-reducing bacteria isolated from environment [12, 13]. However, the data on activity of this enzyme from intestinal sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* and *Desulfomicrobium* sp. has not been reported yet.

The aim of this work was to investigate the dissimilatory APS reductase activity in cell-free extract of intestinal sulfate-reducing bacteria *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 and to carry out the kinetic analysis of the enzymatic reaction.

Materials and Methods

The objects of the study were sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 isolated from the human large intestine and identified [9, 10].

Bacterial growth and cultivation. Bacteria were grown in the nutrition-modified Kravtsov-Sorokin's liquid medium [9]. Before bacteria seeding in the medium, 0.05 ml/l of sterile solution of $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ (1%) was added. A sterile 10N solution of NaOH (0.9 ml/l) in the medium was used to provide the final pH 7.2. The medium was heated in boiling water for 30 min in order to obtain an oxygen-free medium, and then cooled to +30 °C. The bacteria were grown for 72 hours at +37 °C under anaerobic conditions. The tubes were brim-filled with medium and closed to provide anaerobic conditions.

Obtaining cell-free extracts. Cells were harvested at the beginning of the stationary phase, suspended at 4 °C in buffer containing 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), and passed through a Manton-Gaulin press at 9000 psi. The extracts were centrifuged at 4 °C for 10 min at 15.000g; the pellet was then used as sedimentary fraction, and the supernatant obtained was termed the soluble fraction [5]. This extract was subjected to further centrifugation at 180.000g for 1 h to eliminate the membrane fraction. A clear supernatant, containing the soluble fraction, was then used as cell-free extract. Protein concentration in the cell-free extracts was determined by the Lowry method [11].

Assays for APS reductase activity. Enzyme assays were performed by using cell-free extracts, soluble and sedimentary fraction. The enzyme was assayed spectrophotometrically as described in paper [12]. Adenosine 5'-phosphosulfate reductase utilizes the AMP-dependent reduction of ferricyanide occurring in the presence of sulfite. The decrease in absorbance at 420 nm was followed at room temperature (+25 °C). The units of APS reductase were defined as μmoles of ferricyanide reduced per minute. Specific enzyme activity was expressed as $\text{U}\times\text{mg}^{-1}$ protein. The activity of the studied enzyme in the cell-free extracts of both bacterial strains under the effect of different temperature (+20, +25, +30, +35, +40, +45°C) and pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0) in the medium incubation was measured.



Kinetic analysis. Kinetic analysis of the enzyme reaction was performed in a standard incubation medium (as it was described above) with modified physical and chemical characteristics of the respective parameters (the incubation time, substrate concentration, temperature and pH). The kinetic parameters characterizing the ATP sulfurylase reaction are the initial (instantaneous) reaction rate (V_0), maximum rate of the reaction (V_{\max}), maximum amount of the reaction product (P_{\max}) and characteristic reaction time (time half saturation) τ were determined. The amount of the reaction product was calculated stoichiometrically. The kinetic parameters characterizing ATP sulfurylase reactions are Michaelis constant (K_m) and maximum reaction rate of substrate decomposition were determined by Lineweaver-Burk plot [6]. For analysis of the substrate kinetic mechanism of APS reductase, initial velocity rates were measured under standard assay conditions with substrate concentrations (APS). The resulting data were also analysed by global curve fitting in SigmaPlot (Systat Software, Inc.) to model the kinetic data to rapid equilibrium rate equations describing ordered sequential, $V=(V_{\max} [A] [B])/(K_A K_B + K_B [A] + [A] [B])$, and random sequential, $V=(V_{\max} [A] [B])/(\alpha K_A K_B + K_B [A] + K_A [B] + [A] [B])$, kinetic mechanisms, where V is the initial velocity, V_{\max} is the maximum velocity, K_A and K_B are the K_m values for substrates A and B, respectively, and α is the interaction factor if the binding of one substrate changes the dissociation constant for the other [14].

Statistical analysis. Kinetic and statistical calculations of the results were carried out using the software MS Office and Origin computer programs. The research results were treated by the methods of variation statistics using Student *t*-test. The equation of the straight line that the best approximates the experimental data was calculated by the method of least squares. The absolute value of the correlation coefficient *r* was from 0.90 to 0.98. The statistical significance of the calculated parameters of line was tested by the Fisher's *F*-test. The accurate approximation was when $P \leq 0.05$ [1].

Results and Discussion

Activity of adenosine 5'-phosphosulfate reductase, an important enzyme in the process of dissimilatory sulfate reduction in sulfate-reducing bacteria, was measured in different fractions (cell-free extract, soluble, and sedimentary) obtained from *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 cells (Table 1). The results of this study showed that the highest specific activity of the enzyme was 0.51 ± 0.053 and 0.17 ± 0.016 $U \times mg^{-1}$ protein for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively, in soluble fraction. Slightly lower activity of APS reductase for both bacterial strains was detected in the cell-free extract compared to soluble fraction. Its values designated 0.34 ± 0.029 $U \times mg^{-1}$ protein for *D. piger* Vib-7 and 0.11 ± 0.012 $U \times mg^{-1}$ protein for *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. There was not observed enzyme activity in sedimentary fraction.

The effect of temperature and pH of the incubation medium on the APS reductase activity in the cell-free extracts of the sulfate-reducing bacteria was studied (Fig. 1). The maximum specific activity for both bacterial strains was determined at +35 °C.



Table 1

APS reductase activity in different fractions obtained from *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 cel

Sulfate-reducing bacteria	Specific activity of APS reductase (U×mg ⁻¹ protein)		
	Cell-free extract	Individual fractions	
		Soluble	Sedimentary
<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	0.34±0.029	0.51±0.053	0
<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9	0.11±0.012**	0.17±0.016***	0

Comment: The assays were carried out at protein concentration of 48.12 mg/ml (for *D. piger* Vib-7) and 43.75 mg/ml (for *Desulfomicrobium* sp. Rod-9). Enzyme activity was determined after 30 min of incubation. Statistical significance of the values M±m, n = 3; **P<0.01, ***P<0.001, compared to *D. piger* Vib-7 strain.

An increase or decrease in temperature of incubation leads to a decrease of the activity of studied enzyme in the cell-free bacterial extracts. The highest enzyme activity of APS reductase was determined in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 at pH 8.0.

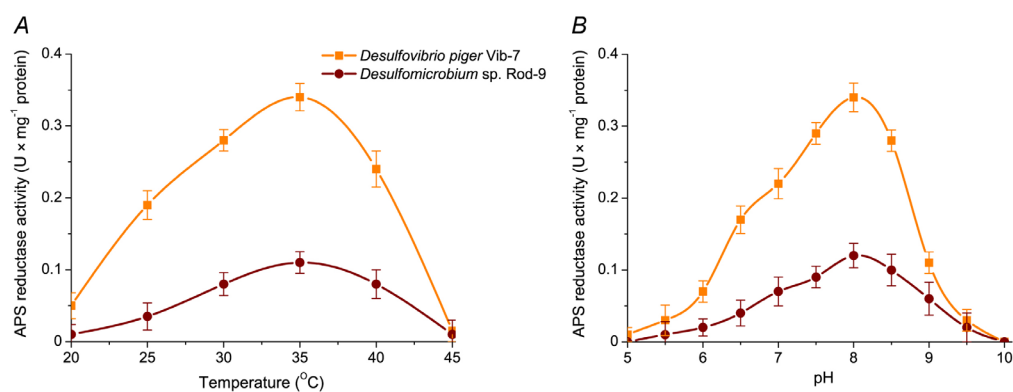


Fig. 1. Effect of temperature (A) and pH (B) on the APS reductase activity in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9

Thus, temperature and pH optimum of this enzyme with APS as a substrate was +35°C and pH 8.0, respectively. The enzyme activity exhibited typical bell-shaped curves as a function of temperature and pH.

To study the characteristics and mechanism of APS reductase reaction, the initial (instantaneous) reaction rate (V_0), maximum rate of the reaction (V_{max}), maximum amount of reaction product (P_{max}) and reaction time (τ) were defined. Dynamics of ferricyanide reduction in the presence of sulfite in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 was studied for investigation of the kinetic parameters of APS reductase (Fig. 2).



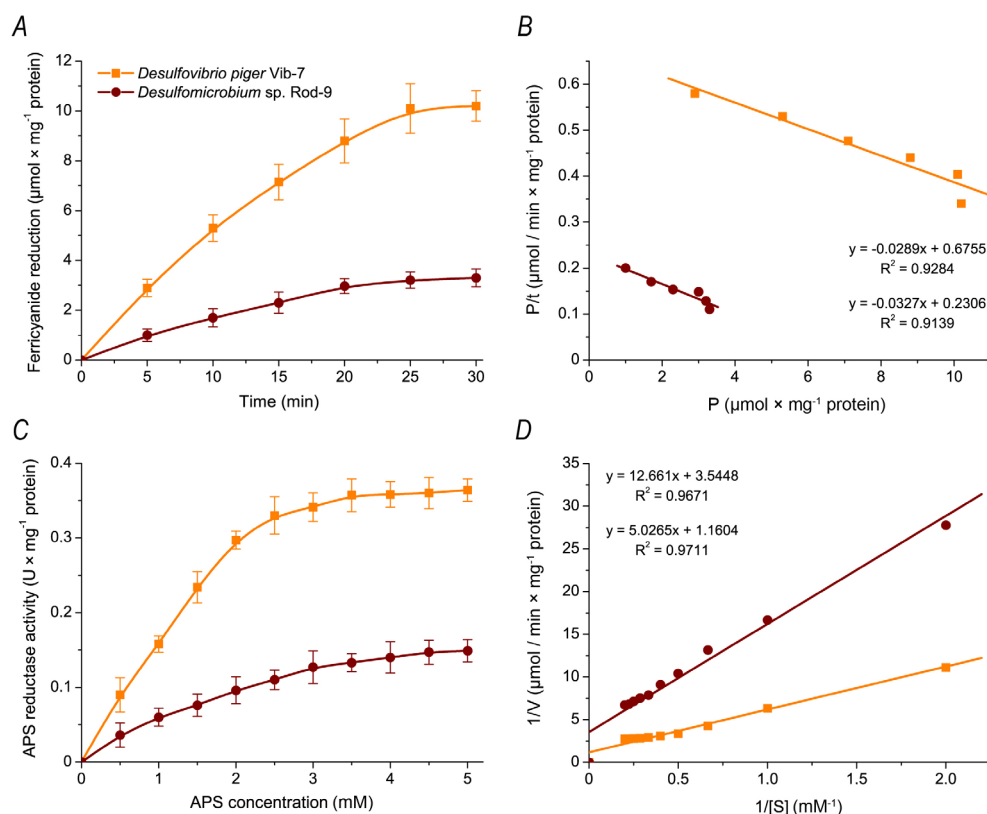


Fig. 2. Kinetic parameters of APS reductase activity in cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9

A – dynamics of product accumulation ($M \pm m$, $n = 3$); *B* – linearization of the curves of product accumulation in $\{P/t; P\}$ coordinates ($n = 3$; $R^2 > 0.9$; $F < 0.02$); *C* – the effect of different APS concentrations on APS reductase activity ($M \pm m$, $n = 3$); *D* – linearization of concentration curves, which shown in Fig. 2C, in the Lineweaver-Burk plot, where V is rate of APS reductase reaction and S is substrate concentration ($n = 3$; $R^2 > 0.95$; $F < 0.005$).

Experimental data showed that the kinetic curves of APS reductase activity have tendency to saturation (Fig. 2A). The analysis of the results allows to reach the conclusion that the kinetics of APS reductase activity in cell-free extracts of the sulfate-reducing bacteria was consistent to the zero-order reaction in the range of 0–10 min (the graph of the dependence of product formation on the incubation time was almost linear in this interval of time). Therefore the duration of the incubation of bacterial cells extracts was 25 min in subsequent experiments.

Amount of product of APS reductase reaction in the *D. piger* Vib-7 was higher compared to the *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 in the entire range of time factor. The basic kinetic properties of the reaction in the cell-free extracts of the sulfate-reducing bacteria were calculated by linearization of the data in the $\{P/t; P\}$ coordinates (Fig. 2B, Table 2).



Table 2

Kinetic parameters of the product accumulation in the cell-free extracts of *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9

Kinetic parameters	Sulfate-reducing bacteria	
	<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9
V_0 ($\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}^{-1}$ protein)	0.675 ± 0.062	$0.231 \pm 0.022^{***}$
P_{max} ($\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1}$ protein)	23.37 ± 2.37	$7.05 \pm 0.71^{***}$
τ (min)	34.60 ± 3.42	30.58 ± 3.14

Comment: V_0 is initial (instantaneous) reaction rate; P_{max} is maximum amount (plateau) of the product of reaction; τ is the reaction time (half saturation period). Statistical significance of the values $M \pm m$, $n = 3$; $***P < 0.001$, compared to the *Desulfovibrio piger* Vib-7 strain.

The kinetic parameters of APS reductase in cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 were significantly different. The values of initial (instantaneous) reaction rate (V_0) for APS reductase activity in the cell-free extracts of both bacterial strains were calculated by the maximum amount of the product reaction (P_{max}). As shown in Table 2, V_0 for APS reductase reaction was higher in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 ($0.675 \pm 0.062 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}^{-1}$ protein) compared to *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ($0.231 \pm 0.022 \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg}^{-1}$ protein). Based on these data, there is an assumption that the *D. piger* Vib-7 can consume APS much faster (approximately three times) in their cells than a *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. Moreover, this hypothetical assumption can be also confirmed by obtained data on the product accumulation in enzymatic reaction, its maximum values designated $23.37 \pm 2.37 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1}$ protein for *D. piger* Vib-7 and $7.05 \pm 0.71 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1}$ protein for *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. However, the reaction time (half saturation period) for APS reduction was almost similar in both bacterial strains.

The kinetic analysis of APS reductase activity dependence on the substrate concentration was executed. According to the obtained results, increasing of sulfite concentrations from 0.5 to 5.0 mM causes a monotonic rise of the studied enzyme activity and the activity was maintained on unchanged level (plateau) under substrate concentrations over 5.0 mM (Fig. 2C). The curves of the dependence $\{1/V; 1/[S]\}$ were distinguished by the tangent slope and intersect the vertical axis in one point (Fig. 2D). The basic kinetic parameters of APS reductase activity in *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 cell-free extracts were identified by linearization of the data in the Lineweaver-Burk plot (Table 3).

Calculation of the kinetic parameters of APS reductase activity indicates that the maximum rate (V_{max}) of product accumulation in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 was significantly different from each other. The maximum rate of APS reaction for *D. piger* Vib-7 was designated 0.862 ± 0.084



$\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}^{-1}$ protein and $0.282\pm 0.027 \mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}^{-1}$ protein for *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 strain. In this case, Michaelis constants (K_m) of APS reductase for both bacterial strains were also different: 4.33 ± 0.47 and 3.57 ± 0.32 mM for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively (Table 3).

Table 3

Kinetic parameters of APS reductase activity dependence on APS concentration in the incubation medium

Kinetic parameters	Sulfate-reducing bacteria	
	<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9
V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}\times\text{mg}^{-1}$ protein)	0.862 ± 0.084	$0.282 \pm 0.027^{***}$
K_m (mM)	4.33 ± 0.47	3.57 ± 0.32

Comment: V_{\max} is maximum rate of the enzyme reaction; K_m is Michaelis constant, determined by substrate. Statistical significance of the values $M \pm m$, $n = 3$; $***P < 0.001$, compared to the *Desulfovibrio piger* Vib-7 strain.

The obtained parameters of APS reductase reaction in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 were differed to data on the enzymatic activity from *P. aeruginosa* defined previously by Bick et al. for APS reductase [3]. The authors have shown that pH and temperature optimum for studied enzyme is 8.5 and $+30^\circ\text{C}$, respectively. However, in our case, pH and temperature optimum for APS reductase activity was 8.0 and $+35^\circ\text{C}$. These data correspond to conditions which are present in the human large intestine from where the bacterial strains were isolated. Perhaps, such conditions provide their intensive development in the gut. Initial enzyme reaction velocity of *P. aeruginosa* was also carried out by Bick et al. to determine the kinetic constants and to compare its activity with that of *E. coli*. The V_{\max} was enzyme reaction was $5.8 \mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}\times\text{mg}^{-1}$ protein and the K_m [APS] was $1.75 \mu\text{M}$ [3].

In summary, the APS reductase activity, V_0 , maximum amount of the product of reaction, APS reaction time (half saturation period), V_{\max} and Michaelis constants were significantly higher in the *D. piger* Vib-7 cells compared to the *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 strain. The maximum APS reductase activity for both strains has been determined at $+35^\circ\text{C}$ and at pH 8.0. The increase or decrease in temperature and pH of incubation leads to decrease of the activity of studied enzyme in the cell-free bacterial extracts. The kinetic parameters of APS reductase reaction depended on the substrate concentration. According to the obtained results, increasing of APS concentrations from 0.5 to 5.0 mM causes a monotonic rise of studied enzyme activity and the activity was maintained on an unchanged level (plateau) under substrate concentrations over 5.0 mM. Michaelis constants (K_m) of the enzyme reaction (4.33 ± 0.47 and 3.57 ± 0.32 mM for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively) were determined. The studies of the physiological and biochemical



properties of the intestinal sulfate-reducing bacteria, the process of the dissimilatory sulfate reduction, in particular participation of APS reductase in this process, the activity and kinetic properties of this enzyme in the *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 bacterial strains, their production of hydrogen sulfide in detail can be perspective for clarification of the etiological role of these bacteria in the development of various diseases of the gastrointestinal tract in humans and animal.

І.В. Кушкевич

Інститут біології тварин НААН України,
вул. В. Стуса, 38, 79034 Львів, Україна,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

АКТИВНІСТЬ ТА КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ АДЕНОЗИН-5'-ФОСФОСУЛЬФАТРЕДУКТАЗИ КИШКОВИХ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

Реферат

*Аденозин-5'-фосфосульфат (АПС) редуктаза та кінетичні властивості цього ферменту кишкових сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio piger* Vib-7 і *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ніколи не були добре охарактеризовані й досі не досліджені. Мета роботи дослідити активність дисиміляційної АПС-редуктази у безклітинних екстрактах кишкових відновлювальних бактерій *D. piger* Vib-7 і *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, а також виконати кінетичний аналіз реакції досліджуваного ферменту. Методи. У цій роботі використані мікробіологічні, біохімічні та біофізичні методи досліджень, а також застосована статистична обробка результатів; отримані результати порівняні з даними літератури. Результати. Досліджено активність дисиміляційної АПС-редуктази сульфатвідновлювальних бактерій, виділених з кишечника людини. Найвища активність цього ферменту ($0,34 \pm 0,029 \text{ U} \times \text{мг}^{-1}$ білка) виміряна у безклітинному екстракті, отриманого з клітин *D. piger* Vib-7, а ніж зі штаму *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ($0,22 \pm 0,018 \text{ U} \times \text{мг}^{-1}$ білка). Визначено оптимальну температуру ($+35^\circ\text{C}$) і рН (8,0) для реакції досліджуваного ферменту. Проведено аналіз кінетичних властивостей бактеріальної АПС-редуктази. Досліджено активність АПС-редуктази, початкову (миттєву) швидкість реакції (V_0) і максимальну швидкість АПС-редуктазної реакції (V_{max}) в обох бактеріальних штамів *D. piger* Vib-7 і *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. Визначено константи Міхаеліса (K_m) для ферментативної реакції ($4,33 \pm 0,47$ і $3,57 \pm 0,32 \text{ мМ}$ для *D. piger* Vib-7 і *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, відповідно). Висновок. Результати досліджень можуть бути перспективними для з'ясування етіологічної ролі цих бактерій у розвитку запальних захворювань кишечника людини і тварин.*

Ключові слова: активність АПС-редуктази, кінетичний аналіз, сульфатвідновлювальні бактерії, кишкові мікробіоценози, запальні захворювання кишечника, виразковий коліт.



И.В. Кушкевич

Институт биологии животных НААН Украины,
ул. В. Стуса, 38, Львов 79034, Украина,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

**АКТИВНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
АДЕНОЗИН-5'-ФОСФОСУЛЬФАТРЕДУКТАЗЫ
КИШЕЧНЫХ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ
БАКТЕРИЙ****Реферат**

Аденозин-5'-фосфосульфат (АПС) редуктаза и кинетические свойства этого фермента кишечных сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio piger* Vib-7 и *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 никогда не были хорошо охарактеризованы и до сих пор неисследованные. **Целью работы** было изучение активности диссимиляционной АПС-редуктазы в бесклеточных экстрактах кишечных сульфатвосстанавливающих бактерий *D. piger* Vib-7 и *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, а также выполнить кинетический анализ реакции исследуемого фермента. **Методы.** В работе использованы микробиологические, биохимические и биофизические методы исследований, а также применена статистическая обработка результатов; полученные результаты сравнены с данными литературы. **Результаты.** Исследовано диссимиляционную АПС-редуктазу сульфатвосстанавливающих бактерий, выделенных из кишечника человека. Самая высокая активность этого фермента ($0,34 \pm 0,029 \text{ U} \times \text{мг}^{-1}$ белка) измерена в бесклеточном экстракте, полученного из клеток *D. piger* Vib-7, чем из штамма *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ($0,22 \pm 0,018 \text{ U} \times \text{мг}^{-1}$ белка). Определено оптимальную температуру (+35 °C) и pH (8,0) для реакции исследуемого фермента. Проведено анализ кинетических свойств бактериальной АПС-редуктазы. Исследовано активность АПС-редуктазы, начальную (мгновенную) скорость реакции (V_0) и максимальную скорость АПС-редуктазной реакции (V_{max}) в обоих бактериальных штаммах *D. piger* Vib-7 и *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. Определено константы Михаэлиса (K_m) для ферментативной реакции ($4,33 \pm 0,47$ и $3,57 \pm 0,32$ мМ для *D. piger* Vib-7 и *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, соответственно). **Вывод.** Результаты исследований могут быть перспективными для выяснения этиологической роли этих бактерий в развитии воспалительных заболеваний кишечника человека и животных.

Ключевые слова: активность АПС-редуктазы, кинетический анализ, сульфатвосстанавливающие бактерии, кишечные микробиоценозы, воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит.



REFERENCES

1. *Bailey N.T.J.* Statistical Methods in Biology. Cambridge University Press. – 1995. – 255 p.
2. *Barton L.L., Hamilton W.A.* Sulphate-Reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems. Cambridge: Cambridge University Pres. – 2010. – 553 p.
3. *Bick J.A., Dennis J.J., Zylstra G.J., Nowack J., Leustek T.* Identification of a New Class of 5'-Adenylylsulfate (APS) Reductases from Sulfate-Assimilating Bacteria // *J Bacteriol.* – 2000. – 182(1). – P. 135–142.
4. *Cummings J.H., Macfarlane G.T., Macfarlane S.* Intestinal Bacteria and Ulcerative Colitis // *Curr Issues Intest Microbiol.* – 2003. – 4. –P. 9–20.
5. *Gavel O.Y., Bursakov S.A., Calvete J.J. et al.* ATP Sulfurylases from Sulfate-Reducing Bacteria of the Genus *DesulfoVibrio*. A Novel Metalloprotein Containing Cobalt and Zinc // *Biochemistry.* – 1998. – 37. – P. 16225–16232.
6. *Keleti T.* Basic Enzyme Kinetics. Akademiai Kiado. – 1988. – 422 p.
7. *Kushkevych I.V.* Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. I. Dissimilatory sulfate reduction // *Sci Int J Biological studies/Studia Biologica.* – 2012. – 6(1). –P. 149–180.
8. *Kushkevych I.V.* Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. II. The role in the diseases development // *Sci Int J Biological studies/Studia Biologica.* – 2012. – 6(2). –P. 221–250.
9. *Kushkevych I.V.* Identification of sulfate-reducing bacteria strains of human large intestine // *Sci Int J Biological studies/Studia Biologica.* – 2013. – 7(3). – P. 115–124.
10. *Kushkevych I.V., Bartos M., Bartosova L.* Sequence analysis of the 16S rRNA gene of sulfate-reducing bacteria isolated from human intestine // *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* – 2014. – 3(2). – P. 239–248.
11. *Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.L., Randall R.J.* Protein determination with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* – 1951. – 193. – P. 265–275.
12. *Peck H.D., Deacon T.E., Davidson J.T.* Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* and *Thiobacillus thioparus*. I. The assay and purification // *Biochim. Biophys Acta.* –1965. – 96. –P. 429–446.
13. *Peck H.D., Van Beeumen J., LeGall J.* Biochemistry of Dissimilatory Sulphate Reduction and Discussion // *Phil Trans R Soc Lond. B.* – 1982. – 298. – P. 443–466.
14. *Segal I.H.* Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems / John Wiley & Sons, New York. 1975.

Стаття надійшла до редакції 4.06.2014 р.



С.Л. Міресь, Н.С. Бобрешова, В.О. Кучеров, К.П. Буга, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

МОДИФІКАЦІЙНА МІНЛИВІСТЬ *AURICULARIA* *AURICULA-JUDAE* ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ

Мета. Визначення особливостей модифікаційної мінливості вегетативного міцелію *Auricularia auricula-judae* залежно від складу поживного середовища за ростовим коефіцієнтом, морфологією колоній та множинними молекулярними формами карбоксилестераз у вегетативному міцелії. **Методи.** Вегетативний міцелій *Auricularia auricula-judae* (Bull.: Fr.) Quél. штаму ONU F201 вирощували на таких середовищах: агаризоване пивне сусло (СА) – контрольний варіант, пшеничний агар (ПА), вівсяний агар (ВА), ячмінний агар (ЯА), гречаний агар (ГА), просяний агар (ПРА), картопляно-глюкозний агар з підвищеним вмістом глюкози (КГА 10 %). Визначали модифікований ростовий коефіцієнт (PKj) та морфологію отриманих колоній. За допомогою електрофоретичного розділення у 7% поліакриламідному гелі встановлювали кількість множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестераз у міцелії з кожного варіанту. Статистичну обробку даних проводили згідно з використанням непараметричного критерію Уїлкоксона. **Результати.** Показано, що залежно від складу субстрату характер росту колоній може змінюватися від щільної, ватоподібної, високої, швидкозростаючої до павутиноподібної, невисокої, повільнозростаючої, кількість ізоформ ферменту варіює від 2 до 10. Причому порядок ранжування за кількістю ізоформ не збігається з таким за ростовим коефіцієнтом міцелію. **Висновки.** Вегетативний міцелій *A. auricula-judae* виказує широку модифікаційну мінливість при культивуванні на різних середовищах, як за морфологічними так і за біохімічними ознаками. Залежно від складу поживного середовища у міцелії *A. auricula-judae* експресується від 2 до 10 ізоформ карбоксилестерази, з яких тільки дві – з Rf 0,50 та 0,54, виявляються у всіх варіантах досліджуваних поживних середовищ.

Ключові слова: *Auricularia auricula-judae*, модифікаційна мінливість, ростовий коефіцієнт, морфологія колоній, ізоформи карбоксилестерази.

Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Quél., або іудине вухо – широко відомий лікарський базидіоміцет, що поступово вводиться у промислове культивування у різних країнах світу з метою отримання біологічно активних речовин [1, 2]. У зв'язку з цим актуальним стає дослідження його модифікаційної мінливості не тільки на рівні морфології колоній, а й на рівні ферментних систем.

Як демонструють дослідження, карбоксилестерази, що відносяться до групи неспецифічних серинових гідролаз є достатньо показовими у цьому плані ферментами [3–5]. Вивчення експресивності множинних молекулярних форм



ферментів разом з мінливістю морфологічних ознак може дати уявлення про те, на якому саме етапі трапляються модифікаційні зміни.

Метою дослідження було вивчення особливостей модифікаційної мінливості вегетативного міцелію *A. auricula-judae* залежно від складу поживного середовища за ростовим коефіцієнтом, морфологією колоній та множинними молекулярними формами карбоксилестераз у вегетативному міцелії.

Матеріали та методи

У роботі використовували штамп *Auricularia auricula-judae* (Bull.: Fr.) Quéf. ONU F201. Вивчення швидкості росту вегетативного міцелію, його культуральних та морфологічних особливостей проводили на щільних середовищах (табл. 1): агаризоване пивне сусло (СА) – контрольний варіант, пшеничний агар (ПА), вівсяний агар (ВА), ячмінний агар (ЯА), гречаний агар (ГА), просяний агар (ПрА), картопляно-глюкозний агар з підвищеним вмістом глюкози (КГА 10 %).

Таблиця 1

Компоненти експериментальних поживних середовищ

Table 1

Components of experimental culture media

Середовище	Компоненти	Кількість
Агаризоване пивне сусло (СА) рН 6,0	Пивне сусло 8 % Агар-агар	1 л 20 г
Пшеничний агар (ПА) рН 5,5	Зерно пшениці H ₂ O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Вівсяний агар (ВА) рН 6	Зерно вівса H ₂ O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Ячмінний агар (ЯА) рН 5,8	Зерно ячменю H ₂ O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Гречаний агар (ГА) рН 5,8	Зерно гречки H ₂ O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Просяний агар (ПрА) рН 6,0	Зерно проса H ₂ O Агар-агар	100 г 1000 мл 20 г
Картопляно-глюкозний агар (КГА 10 %) рН 6,5	Картопля H ₂ O Глюкоза Агар-агар	300 г 1000 мл 100 г 20 г



Зерно відповідного злаку заливали холодною водопровідною водою і залишали на 2–3 год. Набрякле зерно нагрівали на водяній бані 30 хв при температурі 60 °С, потім охолоджували та фільтрували. Далі відвар переливали у скляні колби, додавали агар та автоклаували при 1 атм впродовж 30 хв. Після стерилізації середовище розливали в чашки Петрі, охолоджували та засівали маточним міцелієм 7 добової культури *A. auricula-judae*, вирощеної на сусло-агарі. Вирізаний агаровий блок з вегетативним міцелієм діаметром 1 см поміщали у центр поверхні дослідного середовища та переносили у камеру з температурою 27 °С без освітлення. Експеримент проводили у трьох повторах.

Модифікований ростовий коефіцієнт (PK_j) розраховували за формулою [6]:

$$PK_j = \frac{dhgj}{t},$$

де d – діаметр колонії, мм; h – висота колонії, мм; g – щільність колонії в балах (оцінюються за трибальною шкалою: 1 – павутинна, 2 – середня, 3 – щільна); j – однорідність колонії в балах (оцінюється за чотирьохбальною шкалою: 1 – міцелій неоднорідний, з островками щільного, або повітряного міцелію, 2 – неоднорідна колонія, міцелій відрізняється за морфологією тільки в окремі зоні, 3 – присутність міцелію, який відрізняється за морфологією незначна, 4 – міцелій однорідний); t – вік колонії, доба.

Вивчення культурально-морфологічних ознак вищих базидіоміцетів на різних агаризованих середовищах проводили, використовуючи критерії, описані А.С. Бухало [7]. Враховували тип колонії та її колір, щільність колонії, край та характер її зовнішньої лінії.

Статистичну обробку даних проводили згідно [8] з використанням непараметричного критерію Уїлкоксона.

Визначення множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестераз проводили за допомогою електрофоретичного розділення у 7% поліакриламідному гелі згідно стандартної методики [9], оптимізованої для вивчення карбоксилестераз грибів [10]. Вегетативний міцелій для приготування екстрактів для електрофорезу відбирали з чашок Петрі після того, як він досягав максимального діаметру. Як екстрагент використовували 0,1 М гліцин-NaOH буфер з 1% тритону X-100. Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомогою комп'ютерної програми «АнаИС».

Результати та їх обговорення

Вивчення морфологічних ознак досліджуваного штаму показало, що значення модифікованого ростового коефіцієнту при культивуванні *A. auricula-judae* на еталонному середовищі – сусло-агарі, що зазвичай використовується для первинної ідентифікації штаму за морфологією міцеліальної колонії [11], складало 37,9 (табл. 2).



Таблиця 2

Значення модифікованого ростового коефіцієнту при культивуванні *A. auricula-judae* ONU F201 на різних поживних середовищах

Table 2

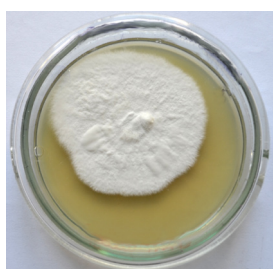
The value of the modified growth coefficient of *A. auricula-judae* ONU F201 cultivated on different media

СА (контроль)	КГА 10 %	ГА	ПА	ЯА	ВА	Пра
37,9	77,6*	56,6 *	37,6	35,6	26,4*	5,0*

Примітка: * – відмінності у порівнянні з контролем (СА) достовірні при статистичному рівні значущості $p \leq 0,05$

Note: * – differences compared with controls (CA) are valid at statistical significance level $p \leq 0,05$

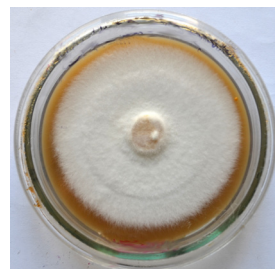
За класифікацією А.С. Бухало [7] таку колонію відносять до такої, що повільно росте. Міцелій, отриманий на цьому середовищі був досить щільним та утворював неоднорідну високу білу ватоподібну колонію (рис. 1 А). У інших варіантах досліджень ростовий коефіцієнт коливався від 5,0 до 77,6.



А – Сусло-агар
(Контроль)



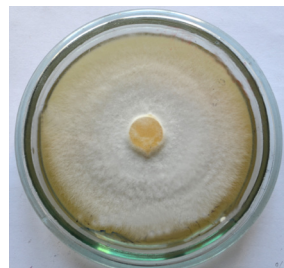
Б – Картопляно-глюкозний
агар 10 %



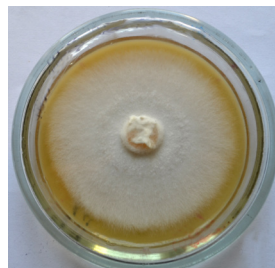
В – Гречаний агар



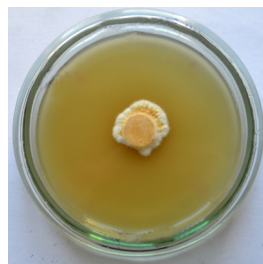
Г – Пшеничний агар



Д – Ячмінний агар



Ж – Вівсяний агар



З – Просяний агар

Рис. 1. Морфологія колоній *A. auricula-judae* ONU F201 на експериментальних середовищах: 8 діб, 27 °C

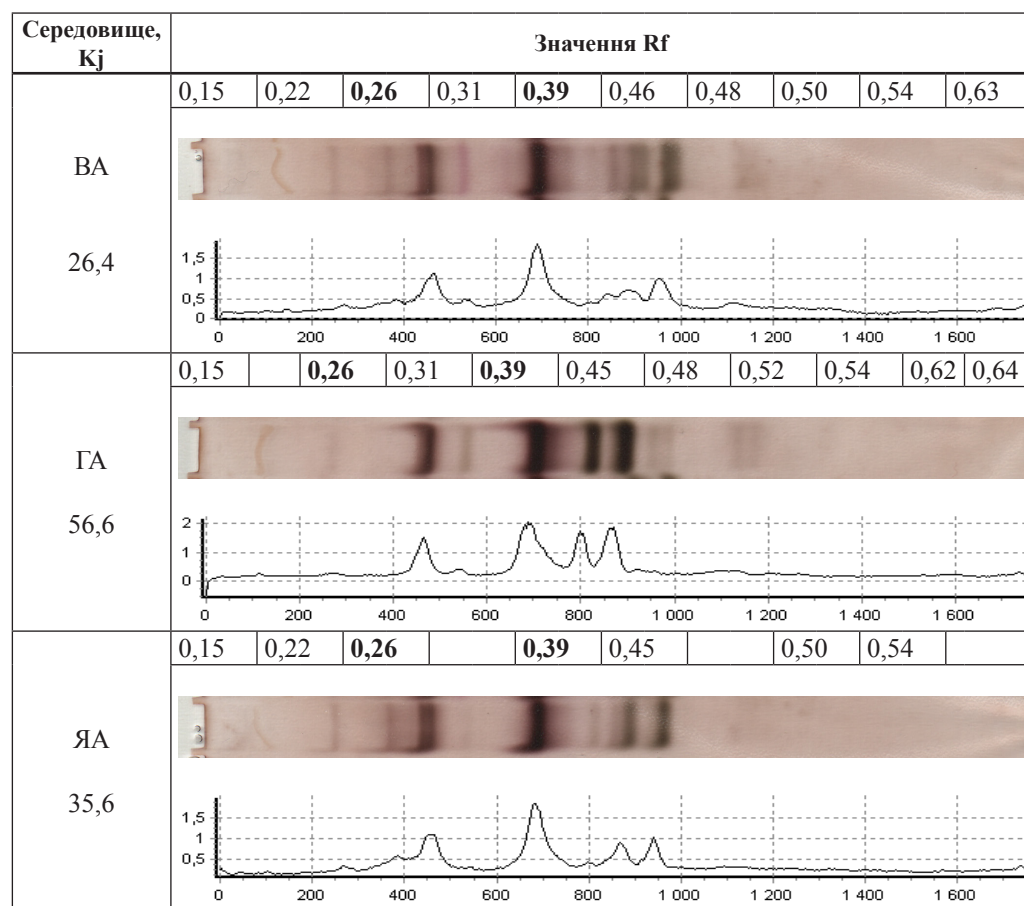
Fig. 1. Morphology of *A. auricula-judae* ONU F201 colonies from experimental media: 8 days, 27 °C

Картопляно-глюкозне агаризоване середовище з підвищеним вмістом глюкози виявилось найкращим з дослідних для *A. auricula-judae*. Міцелій у цьому варіанті мав найвищий ростовий коефіцієнт (77,6) характерний для культур, що ростуть з середньою швидкістю. Морфологія колонії була подібна еталонній (рис. 1 Б). Колонія, отримана на гречаному агарі була нижчою, але також щільною, більш рівномірною і ватоподібною, з ростовим коефіцієнтом 56,6 (рис. 1 В).

Варіант на пшеничному агарі за ростовим коефіцієнтом не відрізнявся від контролю, але утворена ним колонія була менш щільною та високою і більш однорідною (рис. 1 Г).

На ячмінному (рис. 1 Д) та вівсяному агарі (рис. 1 Ж) гриб утворював паутиноподібні невисокі колонії, що мали низький ростовий коефіцієнт (35,6 та 26,4, відповідно). Найгірший результат отримано на просяному агарі, де ростовий коефіцієнт був мінімальним (рис. 1 З).

Досліджено мінливість електрофоретичних спектрів *A. auricula-judae* ONU F201 залежно від складу поживного середовища. На рис. 2 наведено електрофореграми карбоксилестераз у порядку зменшення кількості їх ізоформ у дослідних варіантах.



продовження рис. див на с. 69



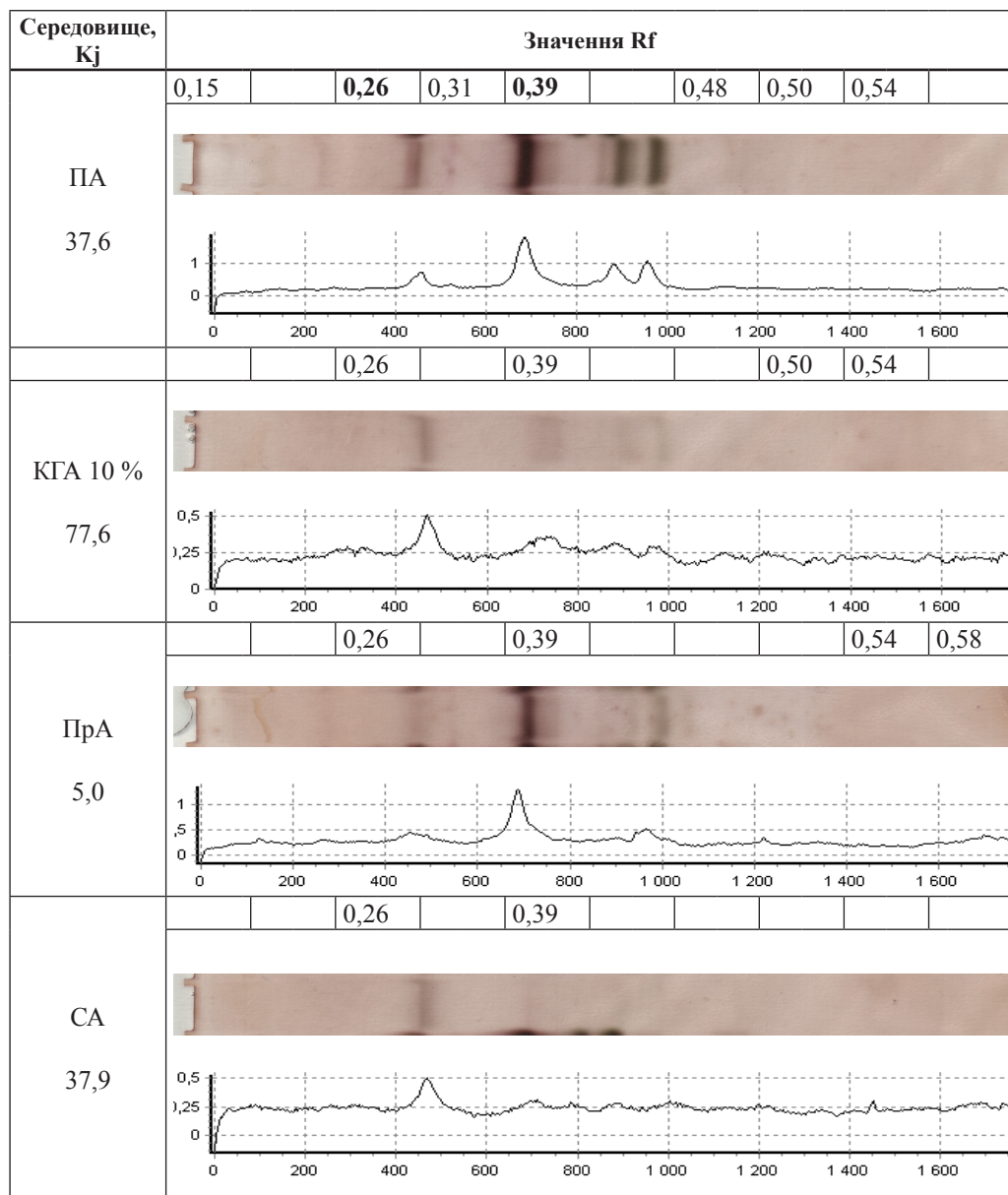


Рис. 2. Експресивність ММФ карбоксилестераз *A. auricula-judae* ONU F201 залежно від складу поживного середовища

Fig. 2. Expressivity of MMF of *A. auricula-judae* ONU F201 carboxylesterases depending on growing media composition

З наведених даних видно, що найменша кількість ММФ карбоксилестераз (2) спостерігається у міцелії, що виріс на контрольному середовищі СА. Аналогічні результати отримано при дослідженні ММФ карбоксилестераз *G. lucidum* у попередніх дослідженнях [10, 12]. Така закономірність, ймовірно, обумовлена

функціями карбоксилестераз грибів, що полягають у гідролізі ефірних зв'язків широкого спектру речовин з наявних субстратів [13].

На інших середовищах кількість ідентифікованих ізоформ коливалася до 10 (ВА і ГА), причому порядок ранжування за кількістю ізоформ не збігається з таким за ростовим коефіцієнтом.

З усього спектру ММФ, що було визначено, тільки дві ізоформи, що спостерігалися у контрольному варіанті (СА) проявлялися в усіх досліджених варіантах – це слаборухлива форма з Rf 0,26 та середньорухлива з Rf 0,39. Виходячи з цього можна припустити, що у *A. auricula-judae* існує шонайменше два неалельних гени, які кодують карбоксилестеразу. Наявність інших, визначених форм може бути результатом посттрансляційної модифікації продуктів зазначених генів, тому що показники їх відносної рухливості знаходяться близько до визначених конститутивних смуг. Причиною таких модифікацій може бути зміна складу поживного середовища, але не виключено існування й інших локусів, гени яких активуються тільки при культивуванні грибів на певних субстратах. Продуктами таких генів можуть бути ізоформи з Rf 0,50 та 0,54. Тому не можна напевно стверджувати чи є варіабельні смуги на електрофореграмах ізоферментами, що різняться на генетичному рівні, чи власно множинними формами, що зазнали посттрансляційної модифікації.

Веgetативний міцелій *A. auricula-judae* виказує широку модифікаційну мінливість при культивуванні на різних середовищах, як за морфологічними так і за біохімічними ознаками. Залежно від складу поживного середовища у міцелії *A. auricula-judae* експресується від 2 до 10 ізоформ карбоксилестерази, з яких тільки дві – з Rf 0,50 та 0,54, виявляються у всіх варіантах досліджуваних середовищ.

С.Л. Мирось, Н.С. Бобрешова, В.А. Кучеров, К.П. Буга,
В.О. Іваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

МОДИФИКАЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *AURICULARIA AURICULA-JUDAE* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Реферат

Цель. Определение особенностей модификационной изменчивости вегетативного мицелия *A. auricula-judae* в зависимости от состава питательной среды по ростовому коэффициенту, морфологии колоний и множественными молекулярными формами карбоксилэстеразы. **Методы.** Вегетативный мицелий *Auricularia auricula-judae* (Bull.: Fr.) Quél. штамма ONU F201 выращивали на



таких средах: агаризованное пивное сусло (СА) – контрольный вариант, пшеничный агар (ПА), овсяный агар (ВА), ячменный агар (ЯА), гречишный агар (ГА), просяной агар (ПРА), картофельно-глюкозный агар с повышенным содержанием глюкозы (КГА 10%). Определяли модифицированный ростовой коэффициент (РК_г) и морфологию полученных колоний. С помощью электрофоретического разделения в 7 % полиакриламидном геле устанавливали количество множественных молекулярных форм (ММФ) карбоксилэстеразы в мицелии каждого варианта. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. **Результаты.** Показано, что в зависимости от состава субстрата характер роста колоний может изменяться от плотной, ватообразной, высокой, быстрорастущей до паутинообразной, невысокой, медленнорастущей; количество изоформ фермента варьирует от 2 до 10. Причем порядок ранжирования по количеству изоформ не совпадает с таковым по ростовому коэффициенту мицелия. **Выводы.** Вегетативный мицелий *A. auricula-judae* проявляет широкую модификационную изменчивость при культивировании на различных средах, как по морфологическим так и по биохимическим признакам. В зависимости от состава питательной среды в мицелии *A. auricula-judae* экспрессируется от 2 до 10 изоформ карбоксилэстеразы, из которых только две – с Rf 0,50 и 0,54, проявляются во всех вариантах исследуемых питательных сред.

Ключевые слова: *Auricularia auricula-judae*, модификационная изменчивость, ростовой коэффициент, морфология колоний, изоформы карбоксилэстеразы.

S. Miros, N. Bobreshova, V. Kucherov, V. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa,
65082, Ukraine, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

MODIFICATION VARIABILITY OF *AURICULARIA AURICULA-JUDAE*, CULTURED ON MEDIA OF DIFFERENT COMPOSITIONS

Summary

Aim. Defining features of modification variability of *A. auricula-judae* vegetative mycelium depending on the composition of the nutrient medium at the coefficient of growth, colony morphology and multiple molecular forms of carboxylesterases.

Methods. Vegetative mycelium of *Auricularia auricula-judae* (Bull.: Fr.) Quél. ONU F201 strain was grown in the following environments: wort agar (CA) – control variant, wheat agar (ПА), oatmeal agar (ВА), barley agar (ЯА), buckwheat agar (ГА), millet agar (ПРА), potato and glucose agar with high glucose content (КГА 10%). The modified coefficient of growth (РК_г) and morphology of the obtained colonies were determined. Using electrophoretic separation on 7% polyacrylamide gels the number of multiple molecular forms (MMF) of carboxylesterases in mycelium of each option were established. Ste statistical analysis of the data was performed using non-parametric Wilcoxon test. The growth character of the colonies ranged from dense cottony, fast growing to arachnoid, slow growing; the number of isoformes



of the enzyme varied from 2 to 10, depending on the composition of the substrate. The rank order of the number of isoforms did not match the rank of the coefficient of growth of mycelium. **Conclusions.** Vegetative mycelium of *A. auricula-judae* has extensive modification variability cultured on different media, both morphological and biochemical characteristics. Depending on the composition of the nutrient medium in the mycelium *A. auricula-judae* expressed from 2 to 10 isoforms of carboxylesterases, only two of which – with Rf 0.50 and 0.54, were determined in all the variants of studied culture media.

Key words: *Auricularia auricula-judae*, modification variability, coefficient of growth, morphology of colonies, carboxylesterase isoforms.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wu Q., Tan Z., Liu H., Gao L., Wu S., Luo J., Zhang W., Zhao T., Yu J., Xu X. Chemical characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its pharmacological effect on heart antioxidant enzyme activities and left ventricular function in aged mice // *Int J Biol Macromol.* – 2010. – № 46(3). – P. 8–248.
2. Huang X.G., Quan Y.L., Guan B., Hu Y. Research progress in *Auricularia auricula* polysaccharide // *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods.* – 2010. – № 10. – P. 25–29.
3. Zhao Z., Liu H., Wang C., Xu J.-R. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi // *BMC Genomics.* – 2013. – P. 1–15. [Доступ до препринту: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/274>]
4. Gupta V. K., Misra A. K., Gaur R., Pandey R., Chauhan U. K. Studies of genetic polymorphism in the isolates of *Fusarium solani* // *Australian Journal of Crop Science.* – 2009. – V. 3(2). – P. 101–106.
5. Постнова Е. Л. Исследование внутреннего полиморфизма штаммов *Ganoderma lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst.: дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. – Москва, 2009. – 23 с.
6. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Под общ. ред. И.А. Дудки. – К. : Наук. думка, 1983. – 312 с.
7. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К. : Наукова думка, 1988. – 144 с.
8. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології: Підручник. – Х.: ХНУ, 2007. – 288 с.
9. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
10. Міресь С.Л., Дуденко Ю.Ю., Бобрешова Н.С., Гудзенко Т.В., Іваниця В. О. Електрофоретичні спектри карбоксилестераз *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. залежно від умов екстрагування та субстрату вирощування // *Мікробіологія і біотехнологія.* – №2(18). – 2012. – С. 52–59.



11. *Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре* : Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – К. : Альтерпрес, 2011. – 212 с.

12. Міроть С.Л., Дьяченко Л.Ф., Бобрешова Н.С., Багаєва О.С., Іваниця В.О. Експресивність ізоформ карбоксилестерази (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P.Karst.) за культивування на середовищах різного складу // *Мікробіологія і біотехнологія*. – № 2. – 2011. – С. 34–40.

13. Lenfant N., Hotelier T., Velluet E., Bourne Y., Marchot P., Chatonnet A. ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 423–429.

Стаття надійшла до редакції 17.03.2014 р.



УДК 579.852.11+616.33

**А.В. Путніков¹, М.П. Рудик¹, В.В. Позур¹, Т.М. Фурзікова¹,
А.М. Остапчук², Г.М. Толстанова¹, Л.М. Сківка¹**

¹ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
просп. Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна, тел.: +38 (044) 521 35 98,
e-mail: steling@bigmir.net;

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР АЦИДОФІЛЬНИЙ» НА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ ЩУРІВ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ АНТИБІОТИКА ЦЕФТРИАКСОНУ

Мета роботи. Дослідити вплив пробіотичного препарату «Симбітер ацидофільний», застосованого на тлі введення антибіотика цефтриаксону на функціональну активність перитонеальних макрофагів щурів лінії Wistar. **Методи.** Метаболічний статус та функціональну поляризацію перитонеальних макрофагів характеризували за адгезією до культурального пластику, спонтанним і стимульованим кисеньзалежним метаболізмом, аргіназною активністю та продукцією NO. **Результати.** Курсове введення препарату «Симбітер ацидофільний» на тлі введення антибіотика цефтриаксону, так само як і курсове введення обох препаратів самостійно, супроводжувалося стимуляцією кисеньзалежного метаболізму макрофагів, а також посиленням метаболізму аргініна за M1-фенотипом, що у сукупності вказує на прозапальну поляризацію активованих мононуклеарних фагоцитів. **Висновок.** Застосування препарату «Симбітер ацидофільний» на тлі курсового введення антибіотика сприяє формуванню нейтрального балансу метаболізму аргініна перитонеальними макрофагами, що може розглядатися як ознака гальмування запального процесу, викликаного тривалим застосуванням антибіотика.

Ключові слова: пробіотик, антибіотик, перитонеальні макрофаги, кисеньзалежний метаболізм, метаболізм аргініна.

Структурні та кількісні зміни кишкової мікробіоти, що виникають внаслідок застосування антибіотиків, можуть бути причиною змін у функціонуванні імунної системи. При цьому спостерігається порушення фагоцитозу макрофагів, кількості Т-л, рівнів ІЛ-2, ІЛ-3, ГМ-КСФ. Виявлено позитивну кореляційну залежність між зменшенням кількості біфідобактерій у кишечнику і зниженням імунологічної реактивності [8]. Хронічні запальні процеси у шлунково-кишковому тракті, можуть призводити до утворення злоякісних

© А.В. Путніков, М.П. Рудик, В.В. Позур, Т.М. Фурзікова, А.М. Остапчук, Г.М. Толстанова, Л.М. Сківка, 2014



пухлин, що асоційовані з підвищеною продукцією цитокінів родини ІЛ-6, у цьому компартменті [13].

При лікуванні інфекцій та асоційованих із прийомом антибіотиків діарей у дорослих та алергій у дітей клінічно доведена ефективність деяких пробіотиків. Однак, механізм таких ефектів залишається досі не з'ясованим. Щоденний прийом деяких препаратів пробіотиків попереджає розвиток та послаблює прояви виразкових колітів і хвороби Крона – захворювань запальної етіології. Комбінований прийом *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii* та застосування *Escherichia coli Nissle* асоціюється з ремісією хронічних запальних хвороб кишечника та послабленням перебігу гострих виразкових колітів [4]. Деякі експериментальні дані свідчать, що про- та пребіотики дуже ефективні в зниженні хронічних запальних процесів, таких як запальні кишкові захворювання та ожиріння [6].

Позитивний ефект пробіотиків на перебіг таких захворювань пов'язують із їх імуномодуляторними властивостями на місцевому та системному рівнях, а саме впливом на антитілоутворення та рівень циркулюючих імунних комплексів, клітинну ланку імунної системи (популяційний склад Т-лімфоцитів, фагоцитарну активність нейтрофілів та макрофагів). Також відомо, що після перорального прийому пробіотиків зростає продукція протизапальних цитокінів (ІЛ-10) та підвищується кількість Т-регуляторних клітин [10]. Деякі дані вказують на те, що окремі штами *Bifidobacterium* проявляють протизапальну дію, пригнічують продукцію NO та ФНП макрофагами. [7].

Метою роботи було дослідити вплив пробіотичного препарату «Симбітер ацидофільний», застосованого на тлі введення антибіотика цефтріаксону на функціональну активність перитонеальних макрофагів щурів лінії Wistar.

Матеріали та методи

В експерименті були використані самці щурів лінії Wistar ($m = 180-230$ г), яких утримували в стандартних умовах віварію ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (12:12 цикл день: ніч, $T_{\text{сер}} = 21^{\circ}\text{C}$). Тварини були розподілені на 4 групи: I – контроль (щурам щоденно вводили внутрішньом'язово (в/м) 0,1 мл води для ін'єкцій, а через 4 год – 1 мл води для ін'єкцій, перорально (*per os*)), $n = 8$; II – щурам щоденно протягом 14 діб вводили в/м 0,1 мл води для ін'єкцій, а через 4 год – 0,16 мл/кг «Симбітер ацидофільний» *per os*, $n = 8$; III – щурам щоденно протягом 14 діб вводили внутрішньом'язово 50 мг/кг цефтріаксону (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна), розведеного у воді для ін'єкцій (сумарна доза складала 700 мг/кг), а через 4 год, вводили *per os* 1 мл води для ін'єкцій, $n = 8$; IV – щурам щоденно протягом 14 діб вводили в/м 50 мг/кг цефтріаксону, а через 4 год, вводили *per os* 0,16 мл/кг «Симбітер ацидофільний», $n = 8$.

«Симбітер ацидофільний» (SYMBITER[®] ACIDOPHILUS, ТОВ «Пролісок», Україна) містить живі клітини пробіотичних мікроорганізмів, КУО/мл:



лактобацили і лактококи – $1,0 \times 10^9$, біфідобактерії – $1,0 \times 10^8$, пропіоновокислі бактерії – $3,0 \times 10^7$, оцтовокислі бактерії – $1,0 \times 10^5$ [1].

Перитонеальні макрофаги (ПМФ), що адгезують до пластику, були отримані із перитонеального ексудату згідно методики Zhang X. et al. [15]. Для цього 2×10^6 клітин у розчині Хенкса вносили у пластикові чашки Петрі (діаметром 3 см), інкубували упродовж 30 хв при 37 °С та 5% CO₂. Клітини, що не адгезували, видаляли та підраховували. Кисеньзалежний метаболізм ПМФ визначали в НСТ-тесті, котрий проводили згідно методики Передерій В.Г. із співав. [2]. Як стимулятор «кисневого вибуху» та продукції нітритів використовували зимозан (Sigma-Aldrich, США) у концентрації 3мг/мл. Оцінку аргіназної активності мононуклеарних фагоцитів проводили стандартним методом за визначенням концентрації сечовини [9]. Для характеристики продукції NO ПМФ визначали рівень продукції ними нітритів у реакції Гріса [9]. Рівень нітритів, визначений з використанням екстраполяції значень екстинції на калібрувальну криву, представляли з розрахунку на 10⁶ живих клітин [9].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, n – кількість тварин у групі. Статистично значущою різницею для всіх показників вважали значення $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Метаболічний статус та функціональну поляризацію макрофагів характеризували за адгезією до культурального пластику, спонтанним і стимульованим кисеньзалежним метаболізмом, аргіназною активністю та продукцією NO. Адгезія до культурального пластику є однією із властивостей макрофагів, котра характеризує їх адгезивну активність. Вважається, що 90 % клітин адгезованої фракції, отриманої з перитонеальної порожнини, складають макрофаги [15].

Як показали результати досліджень (рис. 1), у контрольних тварин відносна кількість адгезованих клітин становила 24%. У щурів дослідних груп показники характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю. У тварин, які отримували курс введення «Симбітер ацидофільний», спостерігалася тенденція до збільшення (у 1,6 разу) відносної кількості адгезованих клітин у порівнянні з показниками в групі інтактних тварин. Ймовірною причиною збільшення відносної кількості адгезивних клітин у перитонеальному ексудаті може бути здатність бактеріальних антигенів, що входять до складу препарату «Симбітер ацидофільний», спричинити міграцію (рекрутинг) макрофагів і/або підвищувати рівень їх адгезивної активності [12]. Застосування цефтріаксону призводило до незначного зменшення числа адгезованих клітин у перитонеальному ексудаті у порівнянні з інтактим контролем, що може бути пояснено імунотоксичною дією антибіотика [5] і/або його негативним впливом на адгезивну активність мононуклеарних фагоцитів [11]. При комбінованому застосуванні цефтріаксону та «Симбітер ацидофільний», кількість адгезованих клітин у перитонеальній порожнині була порівняною із відповідними значеннями у тварин, що отримували цефтріаксон.



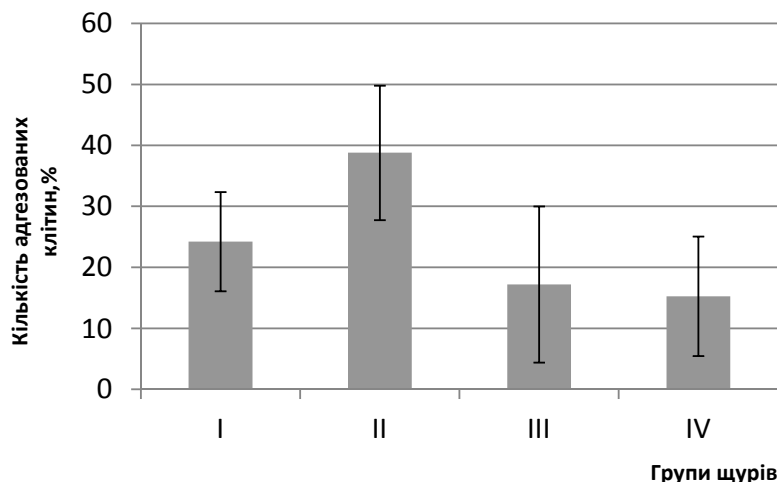


Рис. 1. Вплив пробіотика «Симбітер ацидофільний» на відносну кількість адгезованих клітин у перитонеальній порожнині щурів на тлі введення цефтріаксону

I – контрольні щури (n = 8); II – щури, які отримували «Симбітер ацидофільний» (n = 8), III – щури, яким вводили цефтріаксон (n = 8), IV – щури, яким вводили цефтріаксон та «Симбітер ацидофільний» (n = 8).

Fig. 1. Effect of the probiotic «Symbiter acidophilic» on the relative amount of adherent cells in peritoneal cavity of rats under the course of ceftriaxone injections

I – control rats (n = 8); II – rats which received «Symbiter acidophilic» (n = 8); III – rats which were injected with ceftriaxone (n = 8); IV – rats which received «Symbiter acidophilic» and ceftriaxone.

Функціональний стан фагоцитів традиційно характеризують за декількома показниками: активовані чи в стані спокою (у порівнянні з контролем), наявність функціонального резерву (відповіді на додаткову стимуляцію *in vitro*), а також за спрямованістю активації. Активація фагоцитів супроводжується значними морфологічними, біохімічними та біофізичними їх перебудовами. Найбільш яскравим функціональним проявом взаємодії фагоцитів з модуляторними чинниками є формування так званого «кисневого вибуху», зумовленого активацією НАДФН-залежної оксидази та ферментів гексозомонофосфатного шунту з утворенням як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних реактивних форм кисню. Тому традиційно стан функціональної активації фагоцитів характеризують саме за їх кисеньзалежним метаболізмом. За результатами наших досліджень (рис. 2), стимуляція *in vitro* перитонеальних макрофагів інтактних тварин зимозаном викликала посилення їх метаболічної активності на 68%, що свідчить про наявність функціонального резерву і перебування клітин у нейтральному (неактивованому) стані. Курс пероральних введень «Симбітеру ацидофільного» щурам спричиняв активацію кисеньзалежного метаболізму перитонеальних макрофагів. У пробах клітин тварин цієї групи показники спонтанного кисневого вибуху перевищували такі у контрольних інтактних тварин на 40%.

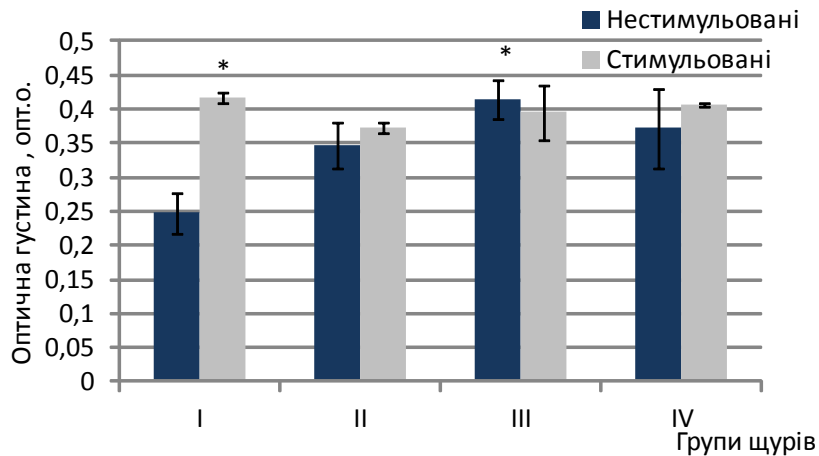


Рис. 2. Вплив пробіотика «Симбітер ацидофільний» на кисеньзалежний метаболізм перитонеальних макрофагів у щурів на тлі введення цефтріаксону

I – контрольні щури (n = 8); II – щури, які отримували «Симбітер ацидофільний» (n = 8), III – щури, яким вводили цефтріаксон (n = 8), IV – щури, яким вводили цефтріаксон та «Симбітер ацидофільний» (n = 8).

Примітка: * – $p \leq 0,05$, у порівнянні з показниками нестимульованих клітин у щурів контрольної групи.

Fig. 2. Effect of the probiotic «Symbiter acidophilic» on rat macrophage oxidative metabolism under the course of ceftriaxone injections

I – control rats (n = 8); II – rats which received «Symbiter acidophilic» (n = 8); III – rats which were injected with ceftriaxone (n = 8); IV – rats that received «Symbiter acidophilic» and ceftriaxone.

Note: * – $p \leq 0,05$ compared with the values of the non-stimulated cells from control rats.

Додаткова стимуляція зимозаном викликала незначне (статистично недостовірне) посилення метаболічної активності. Введення цефтріаксону також спричиняло достовірне збільшення показників спонтанного кисеньзалежного метаболізму фагоцитів щурів на 67% порівняно з аналогічними показниками контролю. Додавання зимозану *in vitro* не викликало стимулювання їх функціональної активності у порівнянні з необробленими клітинами, що вказує на відсутність функціонального резерву клітин, зумовлену перебуванням в активному стані. Введення препарату «Симбітер ацидофільний» на тлі курсового введення антибіотика також супроводжувалося активацією кисеньзалежного метаболізму перитонеальних макрофагів, але рівень цих змін був нижчим порівняно з групою, що отримували цефтріаксон. Реакція клітин у тварин цієї групи на додаткову стимуляцію зимозаном *in vitro* характеризувалася появою функціонального резерву.

Посилення продукції реактивних форм кисню перитонеальними макрофагами у дослідних тварин свідчить про те, що усі застосовані чинники викликають активацію метаболізму цих клітин. Але отримані результати не дають відповіді на питання про спрямованість такої активації.

Згідно із сучасними уявленнями, макрофаги за функціональною активністю поділяють на дві субпопуляції. На початкових стадіях розвитку запалення

вони продукують реактивні форми кисню, прозапальні цитокіни та хемокіни, і розглядаються як «класично активовані» або «кілерні» макрофаги M1. На пізніх стадіях запального процесу ця субпопуляція змінює фенотип на M2 «альтернативно активовані» макрофаги. Їх функція полягає в очищенні від дебрису, активації ангиогенезу та регенеративних процесів [3]. У відповідь на запальні стимули M1-макрофаги продукують індукцибельну синтетазу оксиду азоту (iNOS), яка використовує L-аргінін як субстрат для утворення оксиду азоту (NO). M2-макрофаги конститутивно продукують фермент аргіназу I, яка конкурентно зв'язує L-аргінін, запобігаючи його взаємодії з iNOS, для синтезу орнітину та сечовини. Тому для характеристики функціональної поляризації макрофагів комплексно досліджують показники аргіназної активності цих клітин та концентрацію NO в середовищі їх культивування [14].

Курсове введення пробіотика, антибіотика та одночасне застосування обох препаратів призводило до зниження активності аргінази у дослідних тварин на 22%, 36% та 30%, відповідно, порівняно із значенням для нестимульованих клітин тварин контрольної групи (рис. 3).

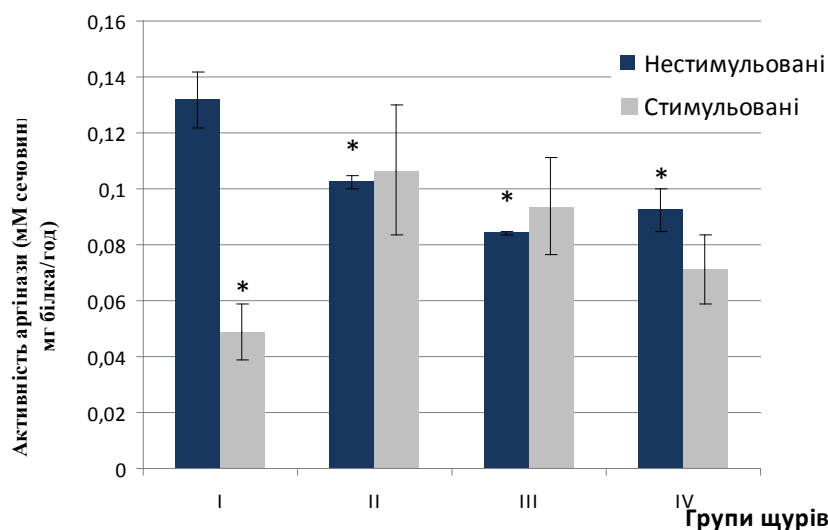


Рис. 3. Вплив пробіотика «Симбітер ацидофільний» на аргіназну активність перитонеальних макрофагів у щурів на тлі введення цефтріаксону

I – контрольні щури (n = 8); II – щури, які отримували «Симбітер ацидофільний» (n = 8), III – щури, яким вводили цефтріаксон (n = 8), IV – щури, яким вводили цефтріаксон та «Симбітер ацидофільний» (n = 8).

Примітка: * – $p \leq 0,05$, у порівнянні з показниками нестимульованих клітин у щурів контрольної групи.

Fig. 3. Effect of the probiotic «Symbiter acidophilic» on arginase activity of rat peritoneal macrophages under the course of ceftriaxone injections

I – control rats (n = 8); II – rats which received «Symbiter acidophilic» (n = 8); III – rats which were injected with ceftriaxone (n = 8); IV – rats which received «Symbiter acidophilic» and ceftriaxone.

Note: * – $p \leq 0,05$ compared with the values of the non-stimulated cells from control rats.



Натомість, продукція NO у тварин усіх дослідних груп була достовірно вищою за аналогічний показник щурів контрольної групи (рис. 4). Отримані результати вказують на прозапальну поляризацію фагоцитів дослідних тварин. Однак, у тварин різних дослідних груп ми спостерігали різний характер змін аргіназної активності та продукції NO у відповідь на додаткову стимуляцію *in vitro* прозапальним чинником – зимозаном. У контрольних тварин додавання зимозану викликало статистично вірогідне зниження аргіназної активності з одночасним достовірним посиленням продукції NO, що вказує на нейтральний баланс метаболізму аргініну у цих клітин.

У тварин, що отримували «Симбітер ацидофільний», аргіназна активність перитонеальних макрофагів була знижена порівняно з такою у інтактних тварин на 22%. Додаткова стимуляція зимозаном не викликала змін метаболізму аргініну, як опосередкованого аргіназою, так і опосередкованого iNOS.

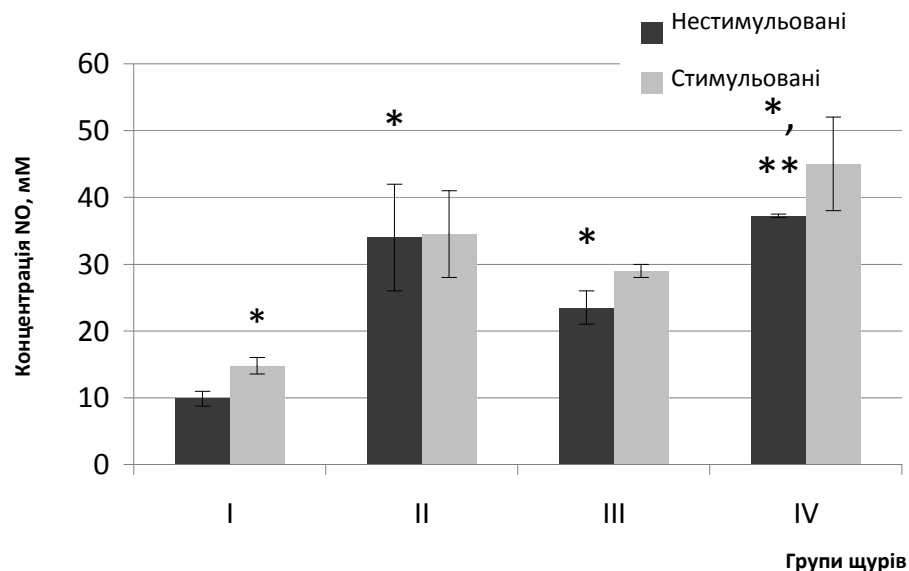


Рис. 4. Вплив пробіотика «Симбітер ацидофільний» на продукцію оксиду азоту перитонеальними макрофагами у щурів на тлі введення цефтріаксону

I – контрольні щури (n = 8); II – щури, які отримували «Симбітер ацидофільний» (n = 8), III – щури, яким вводили цефтріаксон (n = 8), IV – щури, яким вводили цефтріаксон та «Симбітер ацидофільний» (n = 8).

Примітка: * – $p \leq 0,05$, у порівнянні з показниками нестимульованих клітин у щурів контрольної групи, ** – $p \leq 0,05$, у порівнянні з показниками нестимульованих клітин у щурів III групи.

Fig. 4 Effect of the probiotic «Symbiter acidophilic» on NO production by rat peritoneal macrophages under the course of ceftriaxone injections

I – control rats (n = 8); II – rats which received «Symbiter acidophilic» (n = 8); III – rats which were injected with ceftriaxone (n = 8); IV – rats which received «Symbiter acidophilic» and ceftriaxone.

Notes: * – $p \leq 0,05$ compared with the values of the non-stimulated cells from control rats; ** – $p \leq 0,05$ compared with the values of the non-stimulated cells from rats of the III group.



У групі тварин, яким вводили цефтріаксон, спонтанний рівень аргіназної активності перитонеальних фагоцитів був на 36% меншим, ніж у інтактних тварин. Тоді як, синтез NO в перитонеальних макрофагах цієї групи щурів перевищував показники контролю в 2,3 разу. Додаткова стимуляція зимозаном не впливала на утилізацію аргініну аргіназою і викликала незначне (статистично недостовірне) посилення продукції нітритів.

Після курсу комбінованої терапії цефтріаксону з препаратом «Симбітер ацидофільний» спостерігали зниження ефективності метаболізму аргініну (перетворення до кінцевого продукту – сечовини), подібне до такого в інших дослідних групах, і збільшення синтезу NO, як у тварин, яким здійснювали окреме введення пробіотика. Однак, обробка перитонеальних макрофагів щурів, що зазнали комбінованого впливу обох препаратів, зимозаном *in vitro* спричиняла зниження аргіназної активності цих клітин з одночасним посиленням продукції NO. Ці зміни були аналогічні до таких у контрольних тварин. Слід зазначити, що зміни аргіназної активності та продукції NO перитонеальними макрофагами тварин цієї дослідної групи характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю.

Таким чином, курсове введення пробіотичного препарату «Симбітер ацидофільний» на тлі введення антибіотика цефтріаксону, так само як і курсове введення обох препаратів самотійно, супроводжувалося активацією кисень-залежного метаболізму макрофагів, а також активацією метаболізму аргініну з поляризацією до M1-фенотипу, що у сукупності вказує на прозапальну поляризацію активованих мононуклеарних фагоцитів під впливом зазначених чинників. Однак, аналіз реакції перитонеальних макрофагів тварин дослідних груп на додаткову стимуляцію прозапальним чинником *in vitro* виявив, що зміни у метаболізмі аргініну макрофагів у тварин, які отримали «Симбітер ацидофільний» на тлі курсового введення антибіотика, подібні до таких, зареєстрованих у контрольних тварин. Незважаючи на те, що зазначені зміни перебували на межі достовірності, отримані результати свідчать на користь того, що застосування мультипробіотичного перпарату «Симбітер ацидофільний» на тлі курсового введення антибіотика сприяє формуванню нейтрального балансу метаболізму аргініну перитонеальними макрофагами і може розглядатися як ознака гальмування запального процесу, що викликаний тривалим застосуванням антибіотика. Ймовірною причиною зазначеного явища може бути поповнення популяції клітин перитонеального ексудату функціонально нейтральними моноцитами, що циркулюють рекрутованими антигенами бактерій нормобіоти у складі пробіотичного препарату.

А.В. Путніков¹, М.П. Рудик¹, В.В. Позур¹, Т.М. Фурзікова¹,
А.Н. Остапчук², А.Н. Толстанова¹, Л.М. Сківка¹

¹УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко,
просп. Академика Глушкова, 2, Киев, 03022, Украина,
тел.: +38 (044) 521 35 98, e-mail: steling@bigmir.net;

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА «СИМБИТЕР АЦИДОФИЛЬНЫЙ» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫС НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ АНТИБИОТИКА ЦЕФТРИАКСОНА

Реферат

Цель работы. Исследовать влияние пробиотического препарата «Симбитер ацидофильный», примененного на фоне курсового введения антибиотика цефтриаксона, на функциональную активность перитонеальных макрофагов крыс линии Wistar. **Методы.** Метаболический статус и функциональную поляризацию перитонеальных макрофагов характеризовали по адгезии к культуральному пластику, спонтанному и стимулированному кислородзависимому метаболизму, аргиназной активности и продукции NO. **Результаты.** Курсовое введение препарата «Симбитер ацидофильный» на фоне введения антибиотика цефтриаксона, так же как и курсовое введение обоих препаратов отдельно, сопровождалось стимуляцией кислородзависимого метаболизма макрофагов, а также усилением метаболизма аргинина по M1-фенотипу, что в совокупности указывает на провоспалительную поляризацию активированных мононуклеарных фагоцитов. **Вывод.** Применение препарата «Симбитер ацидофильный» на фоне курсового введения антибиотика способствовало формированию нейтрального баланса метаболизма аргинина перитонеальными макрофагами, что может рассматриваться как признак торможения воспалительного процесса, вызванного длительным использованием антибиотика.

Ключевые слова: пробиотик, антибиотик, перитонеальные макрофаги, кислородзависимый метаболизм, метаболизм аргинина.



A.V. Putnikov¹, M.P. Rudyk¹, V.V. Pozur¹, T.M. Furzikova¹,
A.M. Ostapchuk², G.M. Tolstanova¹, L.M. Skivka¹

¹ESC «Institute of Biology» Kyiv National Taras Shevchenko University,
2, Hlushkova Ave., Kyiv, 03022, Ukraine

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU,
154, Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03680, Ukraine

EFFECT OF MULTIPROBIOTIC «SYMBITER ACIDOPHILIC» USED AGAINST THE BACKGROUND OF THE COURSE OF INJECTIONS OF CEFTRIAZONE ANTIBIOTIC ON PERITONEAL MACROPHAGE FUNCTIONAL ACTIVITY IN RAT

Summary

The aim of the work was to investigate the effect of probiotic preparation “Symbiter acidophilic” used against the background of the course of injection of ceftriazone antibiotic on macrophage functional activity in Wistar rats. **Methods.** Metabolic state and functional polarization of peritoneal macrophages were characterized by measurement of their adhesion to the cultural plastic, spontaneous and stimulated oxidative metabolism, arginase activity and NO production. **Results.** The course of injection of the preparation “Symbiter acidophilic” against the background of the course of injection ceftriazone antibiotic, as well as administration of both preparations separately, was associated with the stimulation of macrophage oxidative metabolism accompanied by M1-polarization of arginine metabolism. All together it indicates proinflammatory polarization of activated mononuclear phagocytes. **Conclusion.** Administration of the preparation “Symbiter acidophilic” against the background of the course of injection of ceftriazone antibiotic promoted the forming of neutral balance of arginine metabolism in peritoneal macrophages that can be considered as a sign of inhibition of antibiotic-induced inflammatory process.

Key words: probiotic, antibiotic, peritoneal macrophages, oxidative metabolism, arginine metabolism.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волосовець О.П., Прохорова М.П., Кривопустов С.П., Бичкова Н.Г., Слюсар Н.А. Ефективність мультипробіотика «Сімбітер» у комплексному лікуванні атопічного дерматиту та дерматореспіраторного синдрому у дітей // Современная педиатрия –2010. – Т. 1, № 29. – С. 168–171.
2. Передерий В.Г., Земсков А.М., Бычкова Н.Г., Земсков В.М. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений. – К. : Здоров’я, 1995. – 211 с.
3. Benoit M., Desnues B., Mege J.L. Macrophage polarization in bacterial infections // J. Immunol. – 2008. – 181, № 6. – P. 3733–3739.
4. Dylag K., Hubalewska-Mazgaj M., Szmyd M.S., Brzozowski T. Probiotics in the mechanism of protection against gut inflammation and therapy of gastrointestinal disorders // Curr. Pharm. Des. – 2014. – V. 20, № 7. –P. 1149–1155.



5. *Furuhama K., Benson R.W., Knowles B.J., Roberts D.W.* Immunotoxicity of cephalosporins in mice // *Chemotherapy*. – 1993. – 39, № 4. – P. 278–285.
6. *Jirillo E., Jirillo F., Magrone T.* Healthy effects exerted by prebiotics, probiotics, and symbiotics with special reference to their impact on the immune system // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 2012. – V. 82, № 3. – P. 200–208.
7. *Lee D.K., Kim M.J., Ham J.W., An H.M., Cha M.K., Lee S.W., Park C.I., Shin S.H., Lee K.O., Kim K.J., Ha N.J.* In vitro evaluation of antibacterial activities and anti-inflammatory effects of *Bifidobacterium* spp. addressing acne vulgaris // *Arch. Pharm. Res.* – 2012. – V. 35, № 6. – P. 1065–1071.
8. *Liang Q.H., Zhang L., Duan S.C., Wang P., Zhang Y.C., Luo J.Z., Pang Y.* Influence of intestinal dysbacteriosis on immune and hematopoietic function in mice // *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. – 2004. – V. 42, № 9. – P. 708–711.
9. *Macrophages and dendritic cells. Methods and Protocols* / Edited by Neil E. Reiner. – NY: Humana Press, 2009. – 368 p.
10. *Marranzino G., Villena J., Salva S., Alvarez S.* Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: influence beyond the intestinal tract // *Microbiol. Immunol.* – 2012. – V. 56, № 11. – P. 771–781.
11. *Sanz M.J., Nabah Y.N., Cerdá-Nicolás M., O'Connor J.E., Issekutz A.C., Cortijo J., Morcillo E.J.* Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – 144, № 2. – P. 190–201.
12. *Siegmund B., Zeitz M.* Therapeutic approaches in inflammatory bowel disease based on the immunopathogenesis // *Rocz. Akad. Med. Białymst.* – 2004. – 49. – P. 22–30.
13. *Thiem S., Pierce T.P., Palmieri M., Putoczki T.L., Buchert M., Preaudet A., Farid R.O., Love C., Catimel B., Lei Z., Rozen S., Gopalakrishnan V., Schaper F., Hallek M., Boussioutas A., Tan P., Jarnicki A., Ernst M.* mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice // *J. Clin. Invest.* – 2013. – V. 123, № 2. – P. 767–781.
14. *Weisser S.B., McLarren K.W., Kuroda E., Sly L.M.* Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages // *Methods Mol. Biol.* – 2013. – 946. – P. 225–239.
15. *Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M.* The isolation and characterization of murine macrophages // *Curr. Protoc. Immunol.* – 2008. – Chapter 14:Unit 14.1. – P. 1411–14114.

Стаття надійшла до редакції 30.01.2014 р.



УДК 579.841.11:579.873:579.832

**А.Н. Шульга, М.В. Пристай, И.В. Карпенко, Н.С. Щеглова,
Р.И. Вильданова**

Отделение физико-химии горючих ископаемых ИнФОУ им. Л.М. Литвиненко НАН Украины,
Львов, ул. Научная 3а, 79060, Украина, тел.: +38 (032) 264 07 40,
e-mail: alexshulga@hotmail.com

ВЛИЯНИЕ АЛЮМОКАЛИЕВЫХ КВАСЦОВ НА СИНТЕЗ МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

***Цель.** Исследование стимулирующего влияния алюмокалиевых квасцов (АК) на синтез биогенных поверхностно-активных веществ (биоПАВ) бактериями различных таксономических групп. **Методы.** Бактерии *Pseudomonas* sp. PS-17, *Bacillus subtilis* F, *Rhodococcus erythropolis* Au-1 культивировали на питательных средах с добавлением АК. Биомассу определяли гравиметрическим методом, общие липиды экстрагировали смесью хлороформ:метанол (2:1), концентрацию рамнолипидов определяли орциновым методом, пептидолипидов – образованием комплекса с метиленовым синим, экзополисахаридов – весовым методом, биокомплекс PS (смесь рамнолипидов с полисахаридами) осаждали подкислением супернатанта культуральной жидкости до pH 3. **Результаты.** Показано, что АК в концентрации 0,5–2,0 г/л стимулируют накопление биомассы бактерий и синтез биоПАВ: рамнолипидов штамма *Pseudomonas* sp. PS-17, пептидолипидов штамма *B. subtilis* F и трегалозолипидных биоПАВ штамма *R. erythropolis* Au-1 на 49–100%. **Вывод.** Установлено, что АК стимулируют синтез биоПАВ исследуемыми бактериями. На основе экспериментальных и литературных данных сделано предположение об иницировании у них системы «quorum sensing» под действием АК. Использование АК может позволить оптимизировать технологические процессы выделения биоПАВ и снизить себестоимость продукта.*

К л ю ч е в ы е с л о в а : алюмокалиевые квасцы, рамнолипиды, трегалозолипиды, пептидолипиды.

Биогенные поверхностно-активные вещества (биогенные ПАВ, биоПАВ) представляют собой амфифильные соединения, которые синтезируются различными микроорганизмами. Такие вещества снижают поверхностное и межфазное натяжение водных растворов, солюбилизируют гидрофобные соединения, а также повышают смачиваемость различных поверхностей. Благодаря своей высокой эффективности и, в то же время, низкой токсичности, биогенные ПАВ являются важными продуктами биотехнологии. Одним из основных преимуществ биогенных ПАВ по сравнению с химическими аналогами является их способность к биодegradации. БиоПАВ могут быть использованы при создании современных экологически безопасных технологий для нефтедобывающей,

© А.Н. Шульга, М.В. Пристай, И.В. Карпенко, Н.С. Щеглова, Р.И. Вильданова, 2014



пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, сельского хозяйства, медицины [12].

Наиболее перспективными продуцентами биогенных ПАВ являются бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, которые синтезируют соответственно внеклеточные рамнолипиды и пептидолипиды. Большой интерес представляют также клеточно-связанные трегалозолипидные ПАВ бактерий рода *Rhodococcus* [13]. Однако, практическое применение микробных ПАВ лимитируется низким выходом продукта и его высокой себестоимостью. В связи с этим, наряду с поиском новых эффективных штаммов микроорганизмов-продуцентов биоПАВ актуальной проблемой является разработка методов повышения биосинтеза этих соединений, а также их выделения.

Материалы и методы

В работе использовали микроорганизмы-продуценты биоПАВ из коллекции ОФХГИ ИнФОУ им. Л.М. Литвиненко НАН Украины: штаммы *Pseudomonas* sp. PS-17, *Bacillus subtilis* F, а также *Rhodococcus erythropolis* Au-1 из Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Штамм *Pseudomonas* sp. PS-17 культивировали на питательной среде (г/л): глицерин – 20,0; NaNO_3 – 3,0; дрожжевой экстракт – 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат натрия – 5,0 (pH 6,8-7,0) [16]. Для *R. erythropolis* Au-1 использовали питательную среду (г/л): гексадекан – 25,0; $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ – 1,5; дрожжевой экстракт – 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат натрия – 1,0 (pH 6,8-7,0); а для штамма *B. subtilis* F питательную среду (г/л): сахароза – 20; NH_4NO_3 – 4; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0008; цитрат натрия – 4,0 (pH 6,8-7,0).

Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера (750 мл) в 150 мл питательной среды на ротационной качалке (200 об./мин.) при температуре 28–30 °С в течение 5 суток. В работе использовали дубильные вещества – алюмокалиевые квасцы (АК), которые вносили в стерильную питательную среду в концентрациях от 0,75 до 5,40 г/л.

Абсолютно сухую биомассу бактерий (АСБ) определяли гравиметрическим методом [1]. Поверхностное натяжение водных растворов – методом Дю-Нуи с помощью платинового кольца на тензиометре KRÜSS-K6 (KRÜSS GmbH, Germany). Эмульгирующую активность (E_{24}) супернатанта культуральной жидкости бактерий (СКЖ) определяли методом, описанным В. Gutnick [7]. Внеклеточные и клеточно-связанные биоПАВ выделяли из СКЖ или клеточной массы бактерий методом экстракции смесью хлороформ:метанол (2:1) с последующим выпариванием органического растворителя под вакуумом до постоянной массы экстракта. Концентрацию рамнолипидов определяли орциновым методом на спектрофотометре UVmini-1240 (Shimadzu, Japan) [6]; пептидолипидов – методом на основе образования комплекса пептидолипидов



с метиленовым синим [4]. Биоконплекс PS (смесь рамнолипидов и полисахаридов) осаждали из СКЖ *Pseudomonas* sp. PS-17 добавлением 1N HCl до pH 3,0 [16]. Концентрацию полисахаридов в СКЖ определяли весовым методом [14].

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2010, разницу между средними величинами считали достоверной при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что штамм *Pseudomonas* sp. PS-17 синтезирует внеклеточные поверхностно-активные рамнолипиды, способные снижать поверхностное натяжение водных растворов до 28 мН/м. Одним из наиболее перспективных продуктов биосинтеза данного штамма является комплекс рамнолипидов с биополимерами альгинатной природы (биоконплекс PS), который обладает ярко выраженными поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами [16]. Для стимулирования синтеза биоПАВ исследуемым штаммом в питательную среду вносили АК в различных концентрациях (табл. 1).

Таблица 1

Влияние алюмокалиевых квасцов на накопление биомассы и синтез рамнолипидов штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17

Table 1

Influence of potassium alum on the accumulation of biomass and synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas* sp. PS-17 strain

Концентрация АК, г/л	АСБ, г/л	Биоконплекс PS, г/л	Рамнолипиды, г/л	Продуктивность, рамнолипидов/АСБ, г/г
0,00	4,81±0,38	7,13±0,31	6,12±0,30	1,27
0,50	5,14±0,48	8,12±0,38	6,62±0,35	1,29
0,75	5,42±0,49	8,31±0,45	7,75±0,38	1,43
1,50	5,83±0,44	9,05±0,39	8,56±0,34	1,47
1,80	6,02±0,29*	10,52±0,28*	9,13±0,35*	1,52
2,00	6,85±0,31*	10,26±0,29*	8,95±0,37*	1,31
3,50	5,63±0,38	10,24±0,56*	6,53±0,36	1,16
5,00	1,82±0,18*	3,06±0,12*	2,14±0,10*	1,17

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

Note: * – the differences are significant compared to a control.



Установлена оптимальная концентрация АК в питательной среде – 1,8 г/л, при которой увеличивается синтез рамнолипидов штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17 на 49,2% и биоконплекса PS – на 47,5%. При этом продуктивность по липидам возрастает на 19,7%. При внесении АК в более высоких концентрациях количество биоконплекса PS увеличивалось, однако это было связано с повышением содержания в нем полимеров, а не рамнолипидов (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние алюмокалиевых квасцов на состав
внеклеточного биоконплекса PS штамма *Pseudomonas* sp. PS-17**

Table 2

**Influence of potassium alum on the composition of extracellular
biocomplex of *Pseudomonas* sp. PS-17 strain**

Концентрация АК, г/л	Состав биоконплекса PS, %	
	Рамнолипиды	Полисахариды
0	86,7±3,9	13,3±0,58
1,8	87,4±4,0	13,6±0,51
2,0	87,2±4,2	12,8±0,48
3,5	53,1±2,2*	46,9±0,60*

Примечание:* – различия достоверны по сравнению с контролем.
Note: * – the differences are significant compared to a control.

Добавление АК в питательную среду способствовало также значительному сокращению времени осаждения биоконплекса PS из СКЖ, что, по нашему мнению, может происходить за счет коагуляции рамнолипидов и полисахаридов в присутствии АК. Так, в литературе приводятся данные о том, что АК обладают способностью связывать различные соединения, находящиеся в водном растворе, благодаря чему они получили широкое применение в различных областях, в том числе медицине, для очистки воды и т.д. [3].

Стимулирующее действие АК на синтез внеклеточных биоПАВ показано также на примере пептидолипидов штамма *B. subtilis* F. Установлено, что пептидолипиды в концентрации 1,0 г/л снижают поверхностное натяжение воды до 30 мН/м. Внесение в питательную среду исследуемых бактерий АК в концентрациях 0,5–1,0 г/л способствует увеличению биомассы штамма *B. subtilis* F на 7,7 и 14,4% соответственно. Установлена оптимальная концентрация АК – 0,5 г/л, внесение которой способствует повышению биосинтеза пептидолипидов в 2,6 раза и продуктивности по липидам в 2 раза (табл. 3). При дальнейшем увеличении концентрации АК (1,5–2,0 г/л) отмечается снижение биомассы бактерий и содержания пептидолипидов в СКЖ.

Показано также, что внесение АК в питательную среду культивирования штамма *R. erythropolis* Au-1 способствует синтезу клеточно-связанных липидов,



основная фракция которых представлена трегалозолипидами [2]. Водный раствор этих биоПАВ в концентрации 1,0 г/л снижает поверхностное натяжение воды до 30 мН/м и обладает эмульгирующей активностью (E_{24} 85%).

Таблица 3

Влияние алюмокалиевых квасцов на синтез внеклеточных пептидолипидов и накопление биомассы штамма *B. subtilis* F

Table 3

Influence of potassium alum on the extracellular peptidolipids synthesis and accumulation of biomass by *B. subtilis* F strain

Концентрация АК, г/л	АСБ, г/л	Пептидолипиды, г/л	Пептидолипиды/АСБ, г/г
0	1,95±0,09	0,288±0,180	0,15
0,5	2,10±0,10	0,830±0,388*	0,39*
1,0	2,23±0,10	0,652±0,245*	0,29*
1,5	1,89±0,08	0,317±0,125	0,17
2,0	1,86±0,08	0,277±0,138	0,15

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

Note: * – the differences are significant compared to a control.

Установлена оптимальная концентрация АК (2 г/л) в составе питательной среды, которая способствует увеличению синтеза биоПАВ штаммом *R. erythropolis* Au-1 на 68%. При этом биомасса бактерий практически не меняется относительно контроля, а продуктивность по липидам увеличивается на 17,7% (рис. 1). Дальнейшее увеличение концентрации АК в питательной среде ингибировало рост бактерий и синтез биоПАВ, что, по нашему мнению, связано с антимикробным действием АК в данных концентрациях на исследуемые микроорганизмы.

Благодаря своим физико-химическим свойствам АК вызывают флокуляцию клеток различных микроорганизмов, что значительно облегчает их отделение от культуральной жидкости. Этот процесс особенно важен при выделении биоПАВ из клеток *R. erythropolis* Au-1, которые образуют агломераты при росте на питательных средах с гидрофобными субстратами. Применение АК позволяет легко отделить биомассу бактерий *R. erythropolis* Au-1 от культуральной жидкости минуя стадию центрифугирования. Известно, что эта стадия является энергоемким процессом и требует дополнительного оборудования на производстве. Таким образом, использование АК в технологическом процессе позволит снизить себестоимость продукта, что может иметь большое значение для разработки технологии получения трегалозолипидных ПАВ в промышленных условиях.



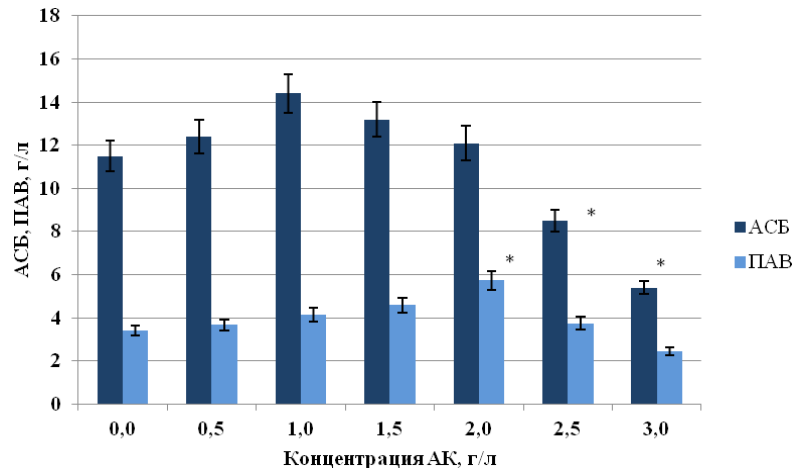


Рис. 1. Влияние алюмокалиевых квасцов на синтез биоПАВ и накопление биомассы штаммом *R. erythropolis* Au-1

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

Fig.1. Influence of potassium alum on the biosurfactants synthesis and accumulation of biomass by *R. erythropolis* Au-1 strain

Note: * – the differences are significant compared to a control.

Известно, что у микроорганизмов существует система межклеточного взаимодействия «quorum sensing», которая запускается при достаточно высокой концентрации клеток, и управляет разнообразными физиологическими процессами, включая биосинтез антибиотиков, экзополисахаридов, биоПАВ и других вторичных метаболитов [13]. Так, у грамотрицательных бактерий *Yersinia enterocolitica* [5] и *Pseudomonas syringae* [11] система «quorum sensing» регулирует подвижность клеток на твердой поверхности, а также принимает участие в контроле агрегации клеток у микроорганизмов *Yersinia pseudotuberculosis* [5], *Pseudomonas aerofaciens* [15] и *Rhodobacter sphaeroides* [10]. Известно [13], что рамнолипиды культуры *Pseudomonas aeruginosa*, синтез которых также контролируется системой «quorum sensing», способствуют подвижности бактерий. Таким образом, система «quorum sensing» инициирует подвижность бактериальных клеток и связанный с этим процессом синтез поверхностно-активных соединений.

Из литературы известно, что дубильные вещества способствуют агрегации бактериальных клеток, а также ограничению их подвижности. Показано [8], что они ингибируют подвижность бактерий *Bacillus cereus* в жидкой среде, способствуют увеличению гидрофобности клеточной стенки, а также стимулируют рост бактерий. О'Мау и др. [9] показали, что танины, выделенные из клюквы и граната, способны блокировать двигательную активность ряда микроорганизмов. В тоже время внесение в питательную среду поверхностно-активных рамнолипидов восстанавливало их подвижность. По данным литературы [8] внесение дубильных веществ в питательную среду при культивировании ряда бактерий, в частности *Prevotella ruminicola* B14, вызывало связывание



(склеивание) клеток между собой внеклеточными полимерами, что снижало двигательную активность микроорганизмов.

Анализируя экспериментальные данные, мы предположили, что агрегация микробных клеток под влиянием дубильных веществ, в частности АК может способствовать инициации системы «quorum sensing» и увеличению синтеза биогенных ПАВ. В случае неподвижных бактерий рода *Rhodococcus* внесение АК в питательную среду, вероятно, может влиять на агрегацию бактериальных клеток вследствие увеличения гидрофобности клеточной стенки, а увеличение синтеза клеточно-связанных трегалозолипидных ПАВ направлено на снижение ее гидрофобности.

Таким образом, показано, что АК в концентрации 0,5–2,0 г/л стимулируют рост бактерий и синтез внеклеточных и клеточно-связанных биогенных ПАВ: рамнолипидов штамма *Pseudomonas* sp. PS-17, пептидолипидов штамма *B. subtilis* F и трегалозолипидов штамма *R. erythropolis* Au-1. При этом также возрастала продуктивность по липидам: на 18–20% для штаммов *Pseudomonas* sp. PS-17 и *R. erythropolis* Au-1 и в 2 раза – для штамма *B. subtilis* F.

Использование АК при производстве биоПАВ может позволить также решить ряд технологических проблем, в частности, оптимизировать процессы осаждения рамнолипид-полисахаридного биокомплекса штамма *Pseudomonas* sp. PS-17, отделения биомассы штамма *R. erythropolis* Au-1 от культуральной жидкости, что соответственно снизит себестоимость биоПАВ и расширит область их использования в экологически чистых технологиях.

**О.М. Шульга, М.В. Пристай, І.В. Карпенко, Н.С. Щеглова,
Р.І. Вільданова**

Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України,
вул. Наукова 3а, Львів, 79060, Україна, тел.: +38 (032) 264 07 40,
e-mail:alexshulga@hotmail.com

ВПЛИВ АЛЮМОКАЛІЄВИХ ГАЛУНІВ НА СИНТЕЗ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ СПОЛУК

Реферат

Мета. Дослідження стимулювального впливу алюмокалієвих галунів (АК) на синтез біоПАВ бактеріями різних таксономічних груп. **Методи.** Штами бактерій культивували на поживних середовищах із додаванням АК. Біомасу визначали гравіметричним методом, загальні ліпіди екстрагували сумішшю хлороформ:метанол (2:1), концентрацію рамноліпідів визначали орциновим методом, пептидоліпідів – утворенням комплексу з метиленовим синім, екзополісахаридів – ваговим методом, біокомплекс PS (суміш рамноліпідів з полісахаридом) осаджували підкисленням без клітинної культуральної рідини до рН 3. **Результати.** Показано, що АК за концентрації 0,5–2,0 г/л стимулюють на-



копичення біомаси бактерій і синтез біоПАР: рамноліпідів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, пептидоліпідів штаму *B. subtilis* F і трегалозоліпідних біоПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 на 49–100%. **Висновок.** Встановлено, що АК стимулює синтез БіоПАР досліджуваними бактеріями. На основі експериментальних і літературних даних зроблено припущення щодо ініціювання у них системи «quorum sensing» за впливу АК. Використання АК дає можливість також оптимізувати технологічні процеси виділення біоПАР та знизити собівартість цих продуктів.

Ключові слова: алюмокалієві галуни, рамноліпід, трегалозоліпід, пептидоліпід.

A. Shulga, M. Prystai, I. Karpenko, N. Shcheglova, R. Vildanova

Department of Physical Chemistry of Fossil Fuels InPOCC, NAS of Ukraine,
3а, Naukova Str, Lviv, 79060, Ukraine, tel.: +38 (032) 264 07 40,
e-mail:alexshulga@hotmail.com

INFLUENCE OF POTASSIUM ALUM ON THE SYNTHESIS OF MICROBIAL SURFACE-ACTIVE COMPOUNDS

Summary

Aim. The investigation of stimulating effect of potassium alum on biosurfactant synthesis by bacteria of different taxonomic groups. **Methods.** Bacterial strains were cultivated on nutrient media with the addition of alum. Biomass was determined by gravimetric method, total lipids were extracted with a mixture of chloroform: methanol (2:1), rhamnolipids concentration was determined by orsyn method, peptidolipids – by forming a complex with methylene blue, exopolysaccharides – by gravimetric method; biocomplex PS (mixture of rhamnolipids and polysaccharides) was precipitated by acidification of the cell-free culture liquid to pH 3. **Results.** It was shown that potassium alum at concentrations of 0.5–2.0 g/l stimulate bacterial biomass accumulation and biosurfactant synthesis: rhamnolipids of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17, peptidolipids of the strain *B. subtilis* F and trehalose lipids of the strain *R. erythropolis* Au-1 on 49–100%. **Conclusion.** It was shown the stimulating effect of potassium alum on biosurfactant synthesis by studied bacteria. Based on the experimental and literature data it was made the assumption that potassium alum initiates «quorum sensing» system. The application of potassium alum may make it possible to optimize the processes of biosurfactants isolation and reduce the cost of these products.

Key words: potassium alum, rhamnolipids, trehalose lipids, peptidolipids.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы общей бактериологии: В 3 т./ Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 535 с.; – Т. 2. – 470 с.; – Т. 3. – 263 с.
2. Пристай М.В., Хоменко Л.А. Здатність штамів *Rhodococcus erythropolis*, *Gordonia rubripertincta* і *Dietzia maris* до синтезу поверхнево-активних речовин // III міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь та поступ



біології» (Львів, квітень, 2007 р.): тез. доп. – Л.: Видавничий центр ЛНУ ім. І.Франка, 2007. – С. 359.

3. Романовская И.И., Шестеренко Ю.А. Способ элиминации фенола с использованием тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизированной в альгинат // Химия и технология воды. – 2010. – Т. 32, № 1. – С. 107–115.

4. Шульга А.Н., Карпенко Е.В., Елисеев С.А., Туровский А.А. Метод определения содержания анионогенных поверхностно-активных пептидолипидов бактериального происхождения // Микробиол. журн. – 1993. – т. 55, № 1. – С. 85–88.

5. Atkinson S., Sockett R.E. Quorum sensing and the lifestyle of *Yersinia* // Curr. Issues Mol. Biol. – 2006. – Vol. 8, № 1. – P. 1–10.

6. Guerra-Santos L.H., Kappeli O., Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – Vol. 48. – P. 301–305.

7. Gutnick D.L., Minas W.A. Perspectives on microbial surfactants // Biochemical Society Transactions. – 1987. – Vol. 15. – P. 228–356.

8. Jones A.R. The role cranberry proanthocyanidins play in the primary attachment of bacteria to surfaces: *Bacillus cereus* model // Biology Dissertations. – 2008. – Paper 51. http://digitalarchive.gsu.edu/biology_diss/51

9. O'May C., Tufenkji N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 9. – P. 3061–3067.

10. Puskas A., Greenberg E. A quorum sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // J. Bacteriol. – 1997. – Vol. 179. – P. 7530–7537.

11. Quinones B., Dulla G., Lindow S. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2005. – Vol. 18. – P. 682–693.

12. Singh A., Van Hamme J.D. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2 Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25. – P. 99–121.

13. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology // Biotechnol. Adv. – 2006. – Vol. 24. – P. 604–620.

14. Williams A.G., Wimpenny J.W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB-12 64 grown in batch culture // Jour. Gen. Microbiol. – 1977. – Vol. 102. – P. 13–21.

15. Zhang Z., Pierson L. A second quorum-sensing system regulates cell surface properties but not phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – P. 4305–4315.

16. Пат. №71792 А Україна 7 С12N1/02 С12R1:38. Поверхнево-активний біопрепарат / О.В. Карпенко, Н.Б. Мартинюк, О.Н. Шульга, Н.С. Щеглова – заявл. 25.12.2003; опубл. 15.12.2004, Бюл. № 12.

Стаття надійшла до редакції 28.01.2014 р.



УДК: 595.143:577.29:612.014

О.К. Фролов¹, Р.О. Литвиненко¹, О.Л. Ребець², І.С. Юрчук²

¹ДВНЗ «Запорізький національний університет» Міністерства освіти і науки України,
вул. Жуковського, буд. 66, Запоріжжя, МСП-41, 69600, Україна

²ДУ «Запорізький обласний лабораторний центр держсанепідслужби України»,
вул. Рекордна, буд. 27, Запоріжжя, 69037, Україна

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН МЕДИЧНОЇ П'ЯВКИ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *ESCHERICHIA COLI* 3912/41

Мета. З'ясувати вплив екзогенних біологічно активних речовин культуральної води, де утримувалися медичні п'явки, на біологічні властивості *Escherichia coli* 3912/41. **Методи.** Готували м'ясо-пептонний агар (МПА) з різною концентрацією культуральної води, де утримувалися медичні п'явки: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%. На поверхню МПА з культуральною водою відповідної концентрації (дослід) та без неї (контроль) вносили робочу суспензію добової культури бактерій *E. coli* 3912/41 з концентрацією клітин 850 КУО/мл. Досліджували культуральні та морфологічні властивості *E. coli*. Зміну антигенних властивостей вивчали в реакції слайд-аглотинації з сироваткою діагностичною ешерихіозною ОКА полівалентною сухою для реакції аглотинації. **Результати.** Виявили пригнічення культуральних властивостей *E. coli*, яке характеризувалося зменшенням колоній починаючи з 1% вмісту культуральної води, де утримувалися медичні п'явки в МПА. При мікроскопічному аналізі виявлено бактерії зі зменшенням розмірів до кокоподібної форми. Зі збільшенням концентрації культуральної води в МПА виявлено порушення видових антигенних властивостей *E. coli*. **Висновки.** Культуральна вода, де утримувалися медичні п'явки, залежно від концентрації в МПА пригнічує культуральні та антигенні властивості *E. coli*. Одержані результати вказують на перспективу використання культуральної води, де утримувалися медичні п'явки, як джерело біологічно активних речовин з бактеріостатичною дією на умовно патогенні бактерії.

Ключові слова: *Escherichia coli*, біологічно активні речовини, медична п'явка, культуральна вода, бактеріостатичний ефект.

Організм медичної п'явки *Hirudo verbana*, Carena, 1820 (МП) продукує комплекс унікальних біологічно активних речовин (БАР) – гірудин, егліни, бделіни, ферменти: гіалуронідаза, дестабілаза, колагеназа, апіраза, еластаза та інші, які проявляють широкий спектр терапевтичних ефектів [2, 3, 4]. Окрім того, доведено, що екстракт слини МП проявляє бактеріостатичну дію, аналогічну до антибіотиків, але без побічних ефектів. У виробленні БАР слини МП бере участь бактерія-ендосимбіонт – *Aeromonas hydrophila* [4, 11, 14]. Тому при гірудотерапії відсутні первинні бактеріальні ускладнення [3, 4]. При культивуванні МП її БАР виділяються у водне середовище (культуральна вода),

© О.К. Фролов, Р.О. Литвиненко, О.Л. Ребець, І.С. Юрчук, 2014



в якому вони містяться разом із іншими продуктами життєдіяльності: екскременти, сеча, слиз та злущені залишки кутикули [4, 11]. Природно припустити, що більшість біологічних властивостей БАР, в тому числі бактеріостатичні, зберігаються і в культуральній воді. **На дане припущення вказує емпіричне застосування гірудотерапевтами останньої при запальних захворюваннях шкіри та слизових оболонок [3].**

Тому метою роботи було з'ясування впливу екзогенних БАР культуральної води з-під МП на біологічні властивості *Escherichia coli* 3912/41.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами дослідження були: екзогенні БАР культуральної води, де утримувалися МП, та штам *E. coli* 3912/41 (0-55 К 59), отриманий із бактеріологічної лабораторії міської санітарно-епідеміологічної станції м. Запоріжжя. Стерильну культуральну воду для дослідження готували з 2 л. культуральної води, отриманої при культивуванні 35–40 товарних МП середнього віку протягом 3 діб, які до цього голодували не менше 4 місяців. З метою усунення зважених речовин воду фільтрували через паперовий фільтр, центрифугували у рефрижераторній центрифугі при 4 °С, 200 g 20 хв. В отриманій культуральній воді, де утримувалися МП, визначали вміст сухого залишку (ГОСТ 18164-72), який складав 275,36 мг/дм³, тоді як в дехлорованій шляхом відстоювання водогінній воді, яку використовують при культивуванні МП – 240,36 мг/дм³. Насад культуральної води отриманий після центрифугування стерилізували шляхом фільтрування за допомогою бактеріальної насадки з діаметром пор 0,23 мкм. Фільтрат перевіряли на стерильність та додавали до м'ясо-пептонного агару (МПА), охолодженого до 45 °С у концентрації: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%.

Із добової культури бактерій штаму *E. coli* 3912/41 готували суспензію у концентрації 850 млн/мл мікробних клітин. З цієї суспензії готували послідовні десятикратні розведення у фізіологічному розчині, використовували робоче розведення 10⁻⁵ КУО/мл. На поверхню МПА з культуральною водою відповідної концентрації (дослід) та без неї (контроль) наносили по 0,1 мл робочої суспензії добової культури бактерій *E. coli* та культивували 24 год при 37 °С.

У бактерій, що виростили на МПА з культуральною водою з-під МП вивчали морфологію, забарвлення за Грамом та антигенні властивості (реакція слайд-аглоїтинації) [1, 5, 7, 9, 10].

При відхиленні дослідного мікроорганізму навіть за однією ознакою від контрольного, його відносили до аномального. Загальну кількість аномальних морфологічних форм бактерій визначали у відсотках.

Зміни антигенної структури досліджуваного штаму *E. coli* виявляли в реакції слайд-аглоїтинації [1, 5] з сироваткою діагностичною ешерихіозною ОКА полівалентною сухою для реакції аглоїтинації (серія № 201, ВАТ «Біомед» ім. І.І. Мечникова, Російська Федерація). В досліді використовували 10 бактеріальних колоній. Наявність аглоїтинації позначали як одиницю, а відсутність – як нуль.



Всі дослідження проводили не менше, ніж в трьох повторах (n), кількість паралельних визначень в експериментах становила не менше трьох. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням пакету прикладних програм IBM SPSS Statistics 20,0. Середнє арифметичне вибірки (x_{cp}) і стандартну похибку (m) розраховували для кожного дослідження. Визначали коефіцієнт кореляції за Пірсоном (r_{xy}) між досліджуваним показником та впливом культуральної води, де утримувалися МП, різної концентрації. Статистично значимими вважали зміни при $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження впливу екзогенних БАР МП на біологічні властивості *E. coli* представлені в таблиці.

Таблиця

Вплив екзогенних БАР культуральної води різної концентрації з-під МП на біологічні властивості *E. coli* ($x_{cp} \pm m$)

Table

Influence of the exogenous BAS from cultural water of medicinal leeches in different concentrations on biological properties of *E. coli* ($x_{cp} \pm m$)

Показник	Кількість визначень, n	Вміст культуральної води в МПА, %					
		0	0,1	1	5	10	15
Життєздатність на МПА, КУО/мл	3	851,3 ±7,06	850,3 ±6,12	798,7 ±6,36	638,0 ±4,16	532,3 ±3,84	398,0 ±3,06
Аномальні форми, %	3	0,0± 0,00	0,0± 0,00	11,0± 1,73	41,0± 2,52	68,0± 4,36	84,0± 3,61
Антигенні властивості, бали	10	1,0± 0,00	1,0± 0,00	0,8± 0,13	0,6± 0,16	0,1± 0,10	0,0± 0,00

При посіві на МПА в контрольних зразках культури утворювали типові плоскі, напівпрозорі, блискучі, випуклі з білувато-жовтим відтінком S-колонії з рівними чи злегка хвилястими краями 3–5 мм в діаметрі, тобто *E. coli* мали типову для ентеробактерій форму [1, 5].

Пригнічення життєздатності *E. coli* на МПА з культуральною водою, де утримувалися МП, порівняно з контролем, відмічалось уже при 5%. Встановлено сильний негативний кореляційний зв'язок між концентраціями культуральної води та життєздатністю *E. coli* на МПА ($r_{xy} = -0,99 \pm 0,001$, $n=3$, $p \leq 0,05$). З підвищенням концентрації культуральної води у МПА спостерігається більш виражена бактеріостатична дія. При аналізі життєздатності і морфології колоній *E. coli* на МПА виявили ознаки пригнічення життєздатності бактерій під дією екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, які проявлялися затримкою росту, появою дрібних колоній на чашках Петрі.

Аналіз морфології бактерій за розміром та забарвленням за Грамом показав, що у дослідних культурах клітини бактерій *E. coli* змінюють форму. Клітини



вкорочуються до овальної та кокоподібної форми. Як свідчать результати наведені у таблиці, аномальні форми мікробних тіл зустрічалися в культурах уже за 1% вмісту культуральної п'явочної води. При 5% – відхилення у морфології мікробів зустрічалися майже у половини мікробних тіл, а при 10% – перевищувало половину, при 15% вмісту аномальні форми складала переважну більшість.

Аномальна морфологія бактеріальних клітин, імовірно, є наслідком порушення метаболізму в мікробній клітині [1], що позначилося на культуральних властивостях *E. coli* – зменшення розмірів мікробних колоній, поява їх дрібних форм на МПА. Виявлені високі позитивні кореляційні зв'язки між концентрацією культуральної води та аномальними морфологічними формами бактеріальних клітин, підкреслюють наявність бактеріостатичної дії екзогенних БАР МП ($r_{xy} = +0,98 \pm 0,01$, $n=3$, $p \leq 0,05$).

Оскільки зміни культуральних та морфологічних властивостей *E. coli* під впливом культуральної води зумовлені порушенням їх метаболізму, вони також можуть супроводжуватися змінами антигенної структури бактерій. Це припущення було підтверджене в реакції слайд-аглютинації, яку ставили з використанням сироватки діагностичної ешерихіозної ОКА полівалентної, яка містить антитіла до О і К антигенів більше 20 основних серологічних груп *E. coli*, які циркулюють серед населення України [1, 5].

Втрата антигенних властивостей *E. coli* відмічалася починаючи з 1% концентрації культуральної води, де утримувалися МП, більш помітною була при 5%, майже повна зміна антигенних властивостей відмічалась при 10%. Кореляційний аналіз щодо наявності взаємозв'язку між впливом екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, різної концентрації та антигенними властивостями *E. coli* в реакції слайд-аглютинації, показує наявність сильного негативного зв'язку ($r_{xy} = -0,81 \pm 0,04$, $n=10$, $p \leq 0,05$).

Можна припустити, що отримані нами дані щодо змін мікроскопічних ознак росту *E. coli* на МПА показують, що екзогенні БАР культуральної води, де утримувалися МП, мають виражену бактеріостатичну дію, подібну до антибіотиків, до яких чутлива *E. coli* на основі літературних даних, представлених нижче. Так, встановлено [11], що культуральна вода МП містить білки сироватки крові годувальника п'явки – альбуміни і глобуліни, а також гірудин, гіалуронідазу, тригліцеридазу, еластазу, апіразу, амінокислоти (в найбільших концентраціях: триптофан, глютамінова кислота, аланін, лізин, лейцин) та біогенні елементи – калій, натрій, фосфор і мікроелементи (селен, йод, бром, сірка). Як відомо, гіалуронідаза та колагеназа виконують бактерицидну та бактеріостатичну дію [6]. Можливо, води оброблені МП також містять антибіотик (хлороміцетин), який виділяє МП [12]. В народній медицині, ветеринарії використовують культуральну воду, де утримувалися МП, для лікування запальних процесів, шлунково-кишкових захворювань, дерматологічних захворювань [цит. по 11]. При обробці бактерій *E. coli* антибіотиками, а також при проходженні курсу антибіотикотерапії, бактеріальні клітини вкорочуються, а колонії на МПА зменшуються в діаметрі та ущільнюються [8, 13]. При цьому автори зазначають, що ці морфологічні прояви можуть відбуватися як результат пригнічення синтезу



клітинної стінки, білка чи РНК, реплікації ДНК або функціонування мембран, залежно від того, що є первинним механізмом дії антибіотика.

Отже, культуральна вода МП пригнічує ріст та життєздатність *E. coli* на МПА, що проявляється затримкою росту, появою дрібних колоній, перехідних морфологічних форм, укороченням розміру бактеріальних клітин. Зміни серологічних ознак *E. coli* під дією екзогенних БАР культуральної води, де утримувалися МП, у реакції слайд-аглотинації, пов'язані зі зміною структури її аглотинаційного антигенного комплексу. Таким чином, одержані результати вказують на перспективу використання культуральної води, отриманої при біотехнології МП, як джерела БАР із бактеріостатичною дією щодо умовно-патогенних штамів бактерій, зокрема *E. coli*.

Таким чином, культуральна вода, отримана при вирощуванні медичної п'явки, містить БАР, які пригнічують життєздатність *E. coli*, порушують нормальну морфологію клітин та антигенні властивості їх оболонки.

А.К. Фролов¹, Р.А. Литвиненко¹, О.Л. Ребець², І.С. Юрчук²

¹ГВУЗ «Запорожский национальный университет»,
ул. Жуковского, д. 66, Запорожье, ГСП-41, 69600, Украина

²ГУ «Запорожский областной лабораторный центр госсанэпидслужбы Украины»,
ул. Рекордная, д. 27, Запорожье, 69037, Украина

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *ESCHERICHIA COLI* 3912/41

Реферат

Цель. Выяснить влияние экзогенных биологически активных веществ культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, на биологические свойства *Escherichia coli* 3912/41. **Методы.** Готовили мясо-пептонный агар (МПА) с различной концентрацией культуральной воды, где содержались медицинские пиявки: 0, 0,1, 1, 5, 10, 15%. На поверхность МПА с культуральной водой соответствующей концентрации (опыт) и без нее (контроль) вносили рабочую суспензию суточной культуры бактерий *E. coli* 3912/41 с концентрацией клеток 850 КОЕ/мл. Исследовали культуральные и морфологические свойства *E. coli*. Изменение антигенных свойств изучали в реакции слайд-аглотинации с сывороткой диагностической ешерихиозной ОКА поливалентной сухой для реакции аглотинации. **Результаты.** Обнаружили угнетение культуральных свойств *E. coli*, которое характеризовалось уменьшением колоний начиная с 1% содержания культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, в МПА. При микроскопическом анализе обнаружены бактерии с уменьшением размеров до коккообразной формы. С увеличением концентрации культуральной воды в МПА выявлены нарушения видовых антигенных свойств *E. coli*. **Выводы.** Культуральная вода, где содержались медицинские пиявки, в зависимости от концентрации



в МПА подавляет культуральные и антигенные свойства E. coli. Полученные результаты указывают на перспективу использования культуральной воды, где содержались медицинские пиявки, как источник биологически активных веществ с бактериостатическим действием на условно патогенные бактерии.

Ключевые слова: Escherichia coli, биологически активные вещества, медицинская пиявка, культуральная вода, бактериостатический эффект.

O.K. Frolov¹, R.O. Litvinenko¹, O.L. Rebets², I.S. Yurchuk²

¹SHEE «Zaporizhzhia National University»,
66, Zhukovsky str, Zaporizhzhia, 69600, Ukraine

²SI «Zaporizhzhia Regional Laboratory Center of State Epidemiological Service Ukraine»,
27, Recordna str, Zaporizhzhia, 69037, Ukraine

INFLUENCE OF MEDICAL LEECH'S EXOGENIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* 3912/41

Summary

Purpose. *To ascertain the effect of exogenous bioactive substances of cultural water, which contained the medicinal leeches on biological properties of Escherichia coli 3912/41. **Methods.** There were prepared the meat-peptone agar (MPA) with various concentrations of the cultural water, which contained the medical leech: 0, 0.1, 1, 5, 10, 15%. On the surface of the MPA with appropriate concentration of cultural water (experiment) and without (control) there were added daily working suspension culture of bacteria E. coli 3912/41 cells at the concentration of 850 CFU/ml. The cultural and morphological properties of E. coli were investigated. Change of the antigenic properties of the reaction was studied in slide agglutination with serum diagnostic polyvalent dry to OKA-antigens of Escherichia for agglutination reaction. **Results.** There were found the cultural properties oppression of E. coli, characterized by the decrease in the colonies from 1% water content of the culture, which contained medicinal leeches in MPA. At microscopic analysis there were detected the bacteria reduction in size to coccus-like forms of bacteria. The antigenic properties of species E. coli infringements with increasing concentration of the cultural water in MPA were found. **Conclusions.** The cultural water, which contained the medical leech, depending on concentration in MPA inhibits cultural and antigenic properties of E. coli. The results indicate the perspective of using cultural water, which contained medicinal leeches as a source of biologically active substances with a bacteriostatic effect on opportunistic bacteria.*

Key words: Escherichia coli, biologically active substances, medicinal leech, cultural water, bacteriostatic effect.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – М.: МИА, 2003. – 236 с.*
2. *Баскова И.П., Завалова Л.Л. Полифункциональность дестабилазы-лизозима из медицинской пиявки // Биоорганическая химия. – 2008. – 34, № 3. – С. 337–343.*
3. *Гирудотерапия: руководство / Под ред. В.А. Савинова. – М.: Медицина, 2004. – 432 с.*
4. *Каменев О.Ю., Барановский А.Ю. Лечение пиявками: теория и практика гирудотерапии: руководство для врачей. – СПб.: Весь, 2006. – 304 с.*
5. *Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія: посібник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.*
6. *Коритнюк Р., Борисенко Т. Пиявочка–козявочка // Фармацевт–практик. – 2009. – № 1. – С. 34–37.*
7. *Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В.В. Миньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.*
8. *Парамонова Н.Ю., Фириченкова С.В. Результаты территориального мониторинга антибиотикорезистентности кишечной палочки // Вестник ветеринарии. – 2011. – № 4 (59). – С. 78–79.*
9. *Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР МЕД, 2001. – 768 с.*
10. *Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. Заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.*
11. *Рассадина Е.В. Экологически обоснованная биотехнология воспроизводства *Hirudo medicinalis* L. в лабораторных условиях: Дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2006. – 199 с.*
12. *Abdullah S., Dar L. M., Rashid A., Tewari A. Hirudotherapy / Leech therapy: applications and indications in surgery // Arch. Clin. Exp. Surg. – 2012. – Vol. 1, № 3. – P. 172–180.*
13. *Kohanski M.A., Dwyer D.D., Collins J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – V. 8. – P. 423–435.*
14. *Laufer A.S., Siddall M.E., Graf J. Characterization of the digestive-tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a European Medicinal leech // Applied and environmental microbiology. – 2008. – 74, № 19. – P. 6151–6154.*

Стаття надійшла до редакції 30.10.2013 р..



ІХ ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

З 9 по 21 червня 2014 року на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, за підтримки Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського та Спільки біологів і біотехнологів Одеси проходила ІХ Літня школа «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія».

Серед слухачів Літньої школи були молоді вчені та аспіранти з університетів та наукових закладів України з Києва, Одеси, Івано-Франківська.

Лекційний курс ІХ Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології висвітлював питання молекулярної генетики і мікробіології, бактеріальної геноміки, еволюції і специфічності геному, молекулярно-генетичних аспектів мікробно-рослинної взаємодії, метагеноміки мікробних угруповань, кластерного аналізу і нумеричної таксономії та ін. Лекції читали: керівник Південного біотехнологічного центру в рослинництві НААНУ акад. НААНУ Ю.М. Сиволап, завідувач відділу сільськогосподарської мікробіології та фізіології рослин ННЦ «Інститут Землеробства НААН» М.В. Патика, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова д.б.н. проф. В.О. Іваниця, співробітник Українського науково-дослідного протичумного інституту к.б.н. О.О. Юрченко, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова к.б.н. Н.Ю. Васильєва, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова к.б.н. Н.В. Ліманська, н.с. Біотехнологічного ННЦ ОНУ імені І.І. Мечникова к.б.н. М.Б. Галкін.

Практичні заняття вели наукові співробітники кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології і Біотехнологічного ННЦ Одеського національного університету імені І.І. Мечникова – с.н.с., к.б.н. Ж.Ю. Сергєєва, н.с., к.б.н. К.Д. Крилова, с.н.с., к.б.н. Т.В. Іваниця, н.с., к.б.н. Г.І. Жумінська, доц., к.б.н. Н.В. Ліманська, с.н.с., к.б.н. Н.Ю. Васильєва, асп. Н.В. Коротаєва, асп. О.С. Боброва та співробітники Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ – завідувач лабораторії, к.б.н. А.М. Остапчук, асп. Н.А. Король.

Впродовж двох тижнів на практичних заняттях учасники ІХ Літньої школи опанували сучасні методи рідинної хроматографії, виділення бактеріальної та фагової ДНК і білків, метод полімеразної ланцюгової реакції, рестрикційний аналіз, електрофорез у поліакриламідному та агарозному гелях, методи титрування та препаративного отримання бактеріофагів, здійснювали трансформацію бактерій плазмідною ДНК, ознайомилися з основними методами біоінформатики та ідентифікації мікроорганізмів за спектром жирних кислот з використанням газової хроматографії.

На урочистому закритті учасники ІХ Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології отримали сертифікати, які вручав керівник Літньої



школи, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету професор, д.б.н. В.О. Іваниця.

Організатори Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології запрошують аспірантів та молодих учених взяти участь у Х Літній школі, яка відбудеться у травні-червні 2015 року!

Телефон: (0482) 68-79-64

Електронна адреса: sergeeva.zh@onu.edu.ua.

Відповідальний секретар
Літньої школи
к.б.н. Ж.Ю. Сергєєва



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

Науковий журнал «Мікробіологія і біотехнологія» запрошує Вас до співпраці з питань висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології і біотехнології.

Програмні цілі видання: висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології та біотехнології, об'єктами яких є прокаріотні (бактерії, архебактерії) та еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми, віруси.

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсиори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

Мова (мови) видання: українська, російська, англійська.

Рубрики журналу: «Оглядові та теоретичні статті», «Експериментальні праці», «Дискусії», «Короткі повідомлення», «Хроніка наукового життя», «Сторінки історії», «Ювілеї і дати», «Рецензії», «Книжкова полиця».

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють співавтори.

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-05/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 8 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 15 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор.

До рукопису додається електронний варіант статті на дискеті (шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; література.

До кожного примірника статті додається анотація мовою оригіналу та реферати українською / російською (в залежності від мови оригіналу статті), та англійською мовами (кожен реферат на окремому аркуші). Особливу увагу слід приділяти написанню резюме статті англійською мовою. Для цього доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором(-ами). Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, повну назву статті відповідною мовою. Реферат обсягом 200—250 слів має бути структурованим: мета (чітко сформульована), методи дослідження, результати дослідження (стисло), узагальнення або висновки. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

У кінці тексту статті указати прізвища, імена та по батькові усіх авторів, поштову адресу, телефон, факс, e-mail (для кореспонденції).

Стаття має бути підписана автором (усіма авторами) з зазначенням дати на останній сторінці.

Автори несуть повну відповідальність за бездоганне мовне оформлення тексту, особливо за правильну наукову термінологію (її слід звіряти за фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то аббревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.



Розділ «Результати досліджень та їх обговорення» має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.

Список літератури складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця) і розміщується в кінці статті. Якщо перший автор у декількох працях один і той самий, то праці розміщуються у хронологічному порядку. Список посилань треба пронумерувати, а у тексті посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел.

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.

Патика В.П., Тихонович І.А. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.; Т. 2. – 470 с.; – Т. 3. – 263 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

Rogers H., Perkins H., Ward I. Microbial cell walls and membranes. – London; New York: Fcfd. Press, 1980. – 364 p.

На журнальні статті

Подгорский В.С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *Мікробіол. журн.* – 1998. – 60, № 5. – С. 27-42.

Андреюк Е.И., Козлова И.А., Рожанская А.М. Микробиологическая коррозия строительных материалов // *Биоповреждения в строительстве*. – М.: Стройиздат, 1984. – С. 209-221.

Глоба Л.І., Подорван Н.І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // *Вісник ОНУ*. – 2001. – т. 6, в. 4. – С. 65-67.

Eaton R.W., Ribbons D.V. Utilization of phtalate esters by micrococci // *Arch. Microbiol.* – 1982. – **132**, № 2. – P. 185-188.



На тези доповідей

Мацелюх Б.П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину E // Міжнародна наук. конф. „Мікробні біотехнології» (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. – О.: „Астропринт», 2006. – С. 17.

На депоновані наукові роботи

1. *Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У.* Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-B92.

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 17 с.

На автореферати дисертацій

Онищенко О.М. Таксономія і антибіотична активність *Alteromonas*-подібних бактерій Чорного моря: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2003. – 21 с.

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов остаточний варіант тексту статті після рецензування.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки (чітко, синьою або чорною ручкою неправильно закреслити, а поряд з цим на полі написати правильний варіант) і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

У разі затримки редакція, додержуючись графіка, залишає за собою право здати коректуру до друкарні (у виробництво) без авторських правок.

Підпис автора у кінці статті означає, що автор передає права на видання своєї статті редакції. Автор гарантує, що стаття оригінальна; ні стаття, ні рисунки до неї не були опубліковані в інших виданнях.

Відхилені статті не повертаються.

Редакція приймає до друку на сторінках і обкладинках журналу платні рекламні оголошення біотехнологічного та медичного напрямів; виробників лабораторного обладнання, діагностиків, реактивів тощо для наукових досліджень.

Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,
можливі лише за умови посилання на джерело інформації
та з дозволу редакційної колегії.
Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 30.06.2014 р. Формат 70x100/16.
Умов.-друк. арк. 8,7. Тираж 100 прим.
Зам. № 979.

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39