

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 3 рази на рік
Засновано у липні 2006 року

№ 2(52)
2021

Одеса
ОНУ
2021

Засновник
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В. О. Іваниця (Одеса, Україна)
ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т. О. Філіпова (Одеса, Україна)
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т. В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпро, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Мощі (Тукуман, Аргентина), І. І. Панчук (Чернівці, Україна), М. В. Патика (Київ, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), Л. Ф. Суходуб (Суми, Україна), Ф. І. Товкач (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія).

Науковий редактор випуску В. О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І. І. Мечникова

Відповідно до наказу МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.
входить до Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»).

Видання реферується та індексується в наукометричних базах даних: «Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.uran.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Т. В. Іваниця, 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, 2021

Establisher
by Odesa National Mechnykov University.
Registration of state certification: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

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

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), I. I. Panchuk (Chernivtsi, Ukraine), M. V. Patyka (Kyiv, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine), L. F. Sukhodub (Sumy, Ukraine) F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine),

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

According to the order of the Ministry of Education and Science of Ukraine № 1301 from 15.10.2019 it is included in the List of scientific professional editions of Ukraine (category "B").

The edition is referenced and indexed in the scientific metric databases: «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List, Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukraine (journal.uran.ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Research Bib, e-LIBRARY, IBI Factor

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: T. V. Ivanytsia, 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>

© Odesa National Mechnykov
University, 2021

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

В.М. Мокросноп, О.К. Золотарьова АКУМУЛЯЦІЯ α -ТОКОФЕРОЛУ В КЛІТИНАХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ	6
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

В.М. Засць, Л.А. Коломієць, О.Ю. Цуварєв, О.І. Корнелюк ВИДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗ СТРУКТУРИ МУТАНТНОЇ ФОРМИ N-КІНЦЕВОГО КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ <i>BOS TAURUS</i> З ЗАМІНОЮ Trp 40 ТА Trp 87 НА АЛАНІН	27
--	----

Т.В. Гудзенко, О.Г. Горшкова, О.В. Волювач, Т.В. Бурлака, І.П. Метеліцина МІКРОБІОЛОГІЧНА І САНІТАРНО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТІЧНИХ ВОД ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ПІДПРИЄМСТВА	40
--	----

М.Д. Цулукидзе ПОШИРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ОКРЕМИХ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП В СОЛОНЧАКОВИХ ҐРУНТАХ, ЩО ПРИЛЯГАЮТЬ ДО ОЗЕРА КУМІСІ (ГРУЗІЯ)	54
--	----

Н.Ю. Васильєва, Г.В. Ямборко, А.Г. Мерліч, І.В. Страшнова, І.П. Метеліцина ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНУ <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> ONU 547 ТА ЕФІРНИХ ОЛІЙ НА РІСТ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	68
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	83
---	----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

V.M. Mokrosnop, E.K. Zolotareva ACCUMULATION OF α -TOCOPHEROL IN MICROALGAE CELLS	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

V.N. Zayets, L.A. Kolomiets, O.Yu. Tsvarev, A.I. Kornelyuk ISOLATION AND STRUCTURE ANALYSIS OF THE MUTANT FORM OF N-TERMINAL CATALYTIC MODULE OF <i>BOS TAURUS</i> TYROSYL-tRNA SYNTHETASE WITH	27
---	----

T.V. Gudzenko, O.G. Gorshkova, O.V. Voliuvach, T.V. Burlaka, I.P. Metelitsina MICROBIOLOGICAL AND SANITARY-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF WASTE WATER FROM PHARMACEUTICAL COMPANY	40
---	----

M.D. Tsulukidze DISTRIBUTION OF SOME PHYSIOLOGICAL GROUPS OF MICROORGANISMS IN SALINE SOILS ADJACENT TO KUMISI LAKE (GEORGIA)	54
---	----

N. Yu. Vasylieva, G.V. Yamborko, A.G. Merlich, I. V. Strashnova, I.P. Metelitsina THE EFFECT OF BACTERIOCIN <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> ONU 547 AND ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS	68
---	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	83
------------------------------------	----

В.М. Мокросноп, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ; тел.: +38(044) 234 12 59,
e-mail: membrana@ukr.net

АКУМУЛЯЦІЯ α -ТОКОФЕРОЛУ В КЛІТИНАХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

*До теперішнього часу рослинні олії є основним природним джерелом вітаміну Е. Серед сполук групи вітаміну Е найбільшу біологічну активність має α -токоферол, вміст якого в рослинних оліях відносно невеликий. Значно вищі концентрації α -токоферолу (до 4–6 мг/г сух. в.) накопичують деякі мікробіодорості, такі як *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* та ін. Через це останнім часом зростає інтерес до біотехнології мікробіодоростей з метою отримання сировини для виробництва вітамінів. Накопичення токоферолів у біомасі *E. gracilis* відбувається найефективніше за умов міксотрофного культивування.*

Розчинний у ліпідах α -токоферол є компонентом неензиматичної антиоксидантної системи і виконує функцію захисту клітинних мембран від активних форм кисню і вільних радикалів. В результаті багатьох досліджень встановлена залежність рівня накопичення α -токоферолу від умов культивування мікробіодоростей, включаючи інтенсивність світла, фотоперіод, рівень азоту, температуру, тип вуглецевого живлення тощо. При цьому, стресові умови стимулюють накопичення антиоксидантів у фотосинтезувальних організмах, але обмежують нормальну швидкість їхнього росту. Проблема збільшення виходу токоферолів вирішується в системах двоетапного культивування через розділення у часі стадії накопичення біомаси і стадії стимуляції біосинтезу α -токоферолу. Підвищення вмісту токоферолу при цьому досягається завдяки введенню екзогенних джерел вуглецю на етапі накопичення біомаси і лімітування живильного середовища за деякими біогенними елементами на етапі стимуляції синтезу антиоксиданту. У огляді наведені дані про вплив складу живильного середовища, типу живлення, температури, інтенсивності освітлення, техніки культивування на накопичення клітинами мікробіодоростей вітаміну Е.

Ключові слова: мікробіодорості, α -токоферол, двоетапне культивування

Токофероли разом з токотрієнолами складають клас токохроманолів, які синтезуються тільки оксигенними фотосинтезувальними організмами [31, 37] і, в тому або іншому ступені, проявляють активність вітаміну Е. Натуральний вітамін Е – це незамінна поживна речовина для тваринних організмів, яка широко використовується в клінічній та харчовій галузях. Серед 4-х ізоформ



(α -, β -, γ -, δ -) як токотрієнолів, так і токоферолів, найбільш високу біологічну активність має α -токоферол. Він є компонентом неензиматичної антиоксидантної системи, універсальним протектором клітинних мембран від окиснювального пошкодження, забезпечує захист рослинних і тваринних клітин від вільних радикалів і активних форм кисню [16, 37]. α -Токоферол є хіральною молекулою з трьома стереоцентрами. Вісім стереоізомерів α -токоферолу відрізняються за розташуванням груп навколо цих стереоцентрів. Природною формою є RRR- α -токоферол.

Завдяки специфічним хімічним властивостям α -токоферол накопичується в ліпідному бішарі мембран тилакоїдів та оболонки хлоропласту і займає таке положення в мембрані, що перешкоджає контакту кисню з ненасиченими ліпідами мембран, захищаючи їх від перекисної деструкції [20]. Антиоксидантні властивості токоферолів зумовлені здатністю рухомого гідроксилу хроманового ядра безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню ($O_2\cdot$, $HO\cdot$, $HO_2\cdot$), вільними радикалами ненасичених жирних кислот ($RO\cdot$, $RO_2\cdot$) і пероксидами жирних кислот [20]. В клітинах найбільш чутливими до окиснювального пошкодження є мітохондрії, оскільки вони містять велику кількість ненасичених ліпідів, що легко окиснюються. Разом з іншими антиоксидантами (наприклад, аскорбіновою кислотою, каротиноїдами, глутатіоном) α -токоферол підтримує стабільний окисно-відновний статус хлоропластів, стабілізує мембранні структури в клітинах, запобігаючи окисненню подвійних зв'язків в молекулах каротину і вітаміну А, а також SH-груп мембранних білків. Стабілізуючий ефект токоферолу проявляється у зниженні споживання кисню клітинами, підвищенні їх стійкості до гіпоксії, зростанні спряженості мітохондріальних мембран і швидкості утворення АТФ. Токоферол відіграє регулюючу роль у фотосинтезі та метаболізмі макроелементів [30].

Олії є традиційним джерелом вітаміну Е, однак при досить високому загальному рівні цих сполук відносний вміст α -токоферолу в них невеликий і поступається деяким видам мікроводоростей. Питомий внесок α -токоферолу у фракцію вітаміну Е клітин мікроводоростей може досягати 95% [25, 35].

Оскільки споживчий попит на вітамін природного походження зростає, посилюється інтерес до альтернативних продуцентів, таких як мікроскопічні водорості, розробляються і удосконалюються технології культивування водоростей з підвищеним вмістом токоферолів [18].

Біосинтез токоферолу

Протягом останніх десятиліть ензиматичні етапи біосинтезу токоферолу досліджені та детально описані [5, 8]. До біосинтезу токоферолу, який відбувається в основному в пластидах, залучені сполуки з двох метаболічних шляхів (рис. 1): тирозин і гомогентизинова кислота, які виробляються шикіматним шляхом, та фітилдифосфат (ФДФ), який є продуктом метилеритритолфосфатного шляху і утворюється з геранілгеранілдифосфату за участі геранілгеранілредуктази. Обидва субстрати, гомогентизинова кислота і ФДФ, за участю гомогентизинової фітилтрансферази, конденсуються з утворенням 2-метил-6-фітил-1,4-гідрохінону (МФГ), що трансформується до 2,3-ме-



тил-5-фітил-1,4-гідрокінону. Останній за участю токоферолциклази перетворюється у γ -токоферол, з якого синтезується α -токоферол. Ця остання реакція ланцюга біосинтезу каталізується γ -токоферолметилтрансферазою.

В результаті генетичних досліджень, проведених на модельних організмах (*Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* PCC6803), було визначено структурні гени, які кодують основні ферменти синтезу токохроманолів.

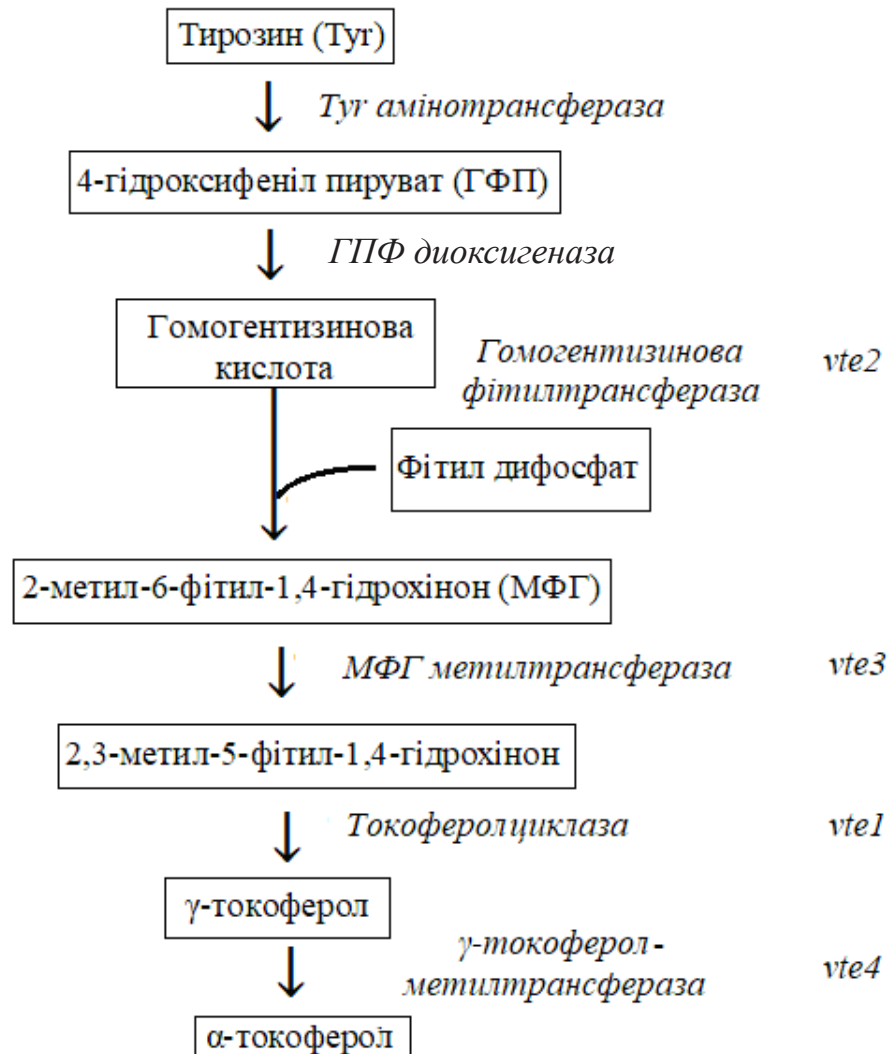


Рис. 1. Схема біосинтезу γ - і α -токоферолів. У правій частині схеми позначені гени, які кодують ключові ензими [8]

Fig. 1. Scheme of the biosynthesis of γ - and α -tocopherols. The right side of the diagram shows the genes that encode key enzymes [8]

Шляхом підвищення/зниження рівня експресії окремих генів, або груп генів біосинтезу токоферолів, вдалося визначити процеси метаболізму, які чинять вплив на акумуляцію токоферолів та покращити вміст та склад цих сполук у дослідних вищих рослинах [8, 40]. Однак існує дуже мало робіт по генетичній модифікації мікроводоростей для збільшення накопичення токоферолу [39].

Акумуляція токоферолу у клітинах мікроводоростей залежить від виду мікроводорості та способу її культивування. Відносно нещодавно в роботі [13] з використанням методів скорострільної протеоміки і високоефективної та надфективної рідинної хроматографії був проведений порівняльний протеомний аналіз метаболічних шляхів біосинтезу α -токоферолу з деякими метаболітами при фототрофному (ФТ), міксотрофному (МТ) і гетеротрофному (ГТ) культивуванні клітин *Euglena gracilis* var. *saccharophila*. Модифіковане внесенням дріжджового екстракту (10 г/л) поживне середовище Хатнера [29] використовували як базове для вирощування всіх варіантів культур. У базове живильне середовище культур МТ- та ГТ- вносили глюкозу до 1,5%. Таким чином, клітини ФТ культур використовували як джерело карбону переважно атмосферний CO_2 , через фотосинтез, МТ- атмосферний CO_2 та глюкозу, ГТ- глюкозу. Всі культури засвоювали частину вуглецю із амінокислот дріжджового екстракту [13].

Результати показали, що режим вирощування має значний вплив як на вміст антиоксидантів, так і на активацію біосинтезу ензимів, залучених до їх формування [13]. Автори виявили в цілому 3843 нерезервних білків, з яких 1890 синтезувалися при всіх режимах культивування. Хоча всі ферменти, необхідні для синтезу α -токоферолу, були знайдені в транскриптомі *E. gracilis* [27], в першому протеомному дослідженні [13] не вдалося виявити послідовності для токоферолциклази (ЕС 5.5.1.24) і токоферол-О-метилтрансферази (ЕС 2.1.1.95) (табл. 1).

Інші ензими шляху біосинтезу α -токоферолу були ідентифіковані на рівні протеому, і всі вони активні в ФТ- культурах.

Експресія ГФП діоксигенази в клітинах ФТ-, МТ- та ГТ- культур, значно зростала при освітленні (табл.1), тоді як в темряві у ФТ- та МТ- культур експресія цього ензиму була слабкішою або значно слабшою, відповідно, а у ГТ- культурі пригнічувалася. Експресія МФГ метилтрансферази в темряві в різному ступені пригнічувалася при всіх режимах культивування: найбільше пригнічення відбувалося в МТ-, а найменше – у ГТ- культурах. Експресія ГФТ/ГГТ в клітинах ФТ- культури дещо активувалася, а у МТ- культурі пригнічувалася, тоді як в ГТ- культурі експресію цих ензимів виявити не вдалося.

Накопичення α -токоферолу в клітинах мікроводоростей за різних режимів культивування

Тип органічного субстрату, джерела вуглецю та/або нітрогену у середовищі мікроводорості має важливе значення для внутрішньоклітинного синтезу вітамінів. Експериментально виявлений вплив таких чинників, як температура, фотоперіод, інтенсивність світла, вміст азоту, тип вуглецевого живлення, вік обраної культури разом із природою екзогенних органічних поживних речовин.



Таблиця 1

Рівні ензимів шляху біосинтезу α -токоферолу у клітинах мікроводорості *E. gracilis* var. *saccharophila* за різних умов культивування (за даними [13])

Table 1

The levels of enzymes of the α -tocopherol biosynthesis pathway in the cells of microalga *E. gracilis* var. *saccharophila* under different conditions of cultivation (according to [13])

Ензими	Наявність/відсутність світла	ФТ	МТ	ГТ
ГФП діоксигеназа	темрява	↑↑	↑	↓↓
	світло	↑↑↑	↑↑	↑↑↑
ГФТ/ГГТ**	світло	↑	↓↓	н/в*
2-МФГМТ***	темрява	↓	↓↓↓	↓↓
Токоферолциклаза	темрява	н/в*	н/в*	н/в*
Токоферол-О-метилтрансфераза	світло	н/в*	н/в*	н/в*

Примітка: У колонці «ФТ» стрілками позначено вміст ензиму у культурі ФТ відносно інших білків під час екстракції, а у колонках «МТ» та «ГТ» – вміст ензиму у культурах МТ і ГТ відносно його значення для ФТ культури. ↑ - ↑↑ - ↑↑↑ - ряд стрілок, що позначають збільшення (зліва на право) відносного вмісту ензиму; ↓ - ↓↓ - ↓↓↓ - ряд стрілок, що позначають зменшення (зліва на право) відносного вмісту ензиму.

*Не виявлено

**Гомогентизинова фітилтрансфераза / геранілгеранілтрансфераза

***МФГ метилтрансфераза

Note: The enzyme content in the FT culture relative to other proteins during extraction is indicated by the arrows in the "FT" column, and relative to its value the enzyme content in MT and GT cultures in the "MT" and "GT" columns. ↑ - ↑↑ - ↑↑↑ - a series of arrows indicating the increase (from left to right) of the relative content of the enzyme; ↓ - ↓↓ - ↓↓↓ - a series of arrows indicating the decrease (from left to right) of the relative content of the enzyme.

* Not found

** Homogentisine phytyltransferase / geranylgeranyl transferase

*** 2-Methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone

Багатьма дослідженнями встановлено, що хоча швидкість росту ФТ-культур значно поступається МТ-культурам найбільш активна акумуляція α -токоферолу в клітинах мікроводоростей відбувається при фотоавтотрофному режимі вирощування [10, 22, 26, 29]. Ці спостереження добре ілюструють дані роботи [13], отримані при порівняльному вивченні динаміки росту і накопичення деяких метаболітів при ФТ-, МТ- і ГТ- культивуванні *E. gracilis* var. *saccharophila* (рис. 2). Видно, що в МТ-культурах протягом перших 24 годин культивування рівень α -токоферолу знижувався до рівня, меншого вихідної концентрації, а потім підвищувався до 1,40 мг×(г сух. в.)⁻¹ (рис. 2а).



В перерахунку на суху масу найбільшу кількість α -токоферолу за 72 год культивування накопичували клітини ФТ-культур: концентрація α -токоферолу у них досягала $2,52 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, тоді як в МТ- і ГТ- культурах – $1,40$ і $0,21 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, відповідно.

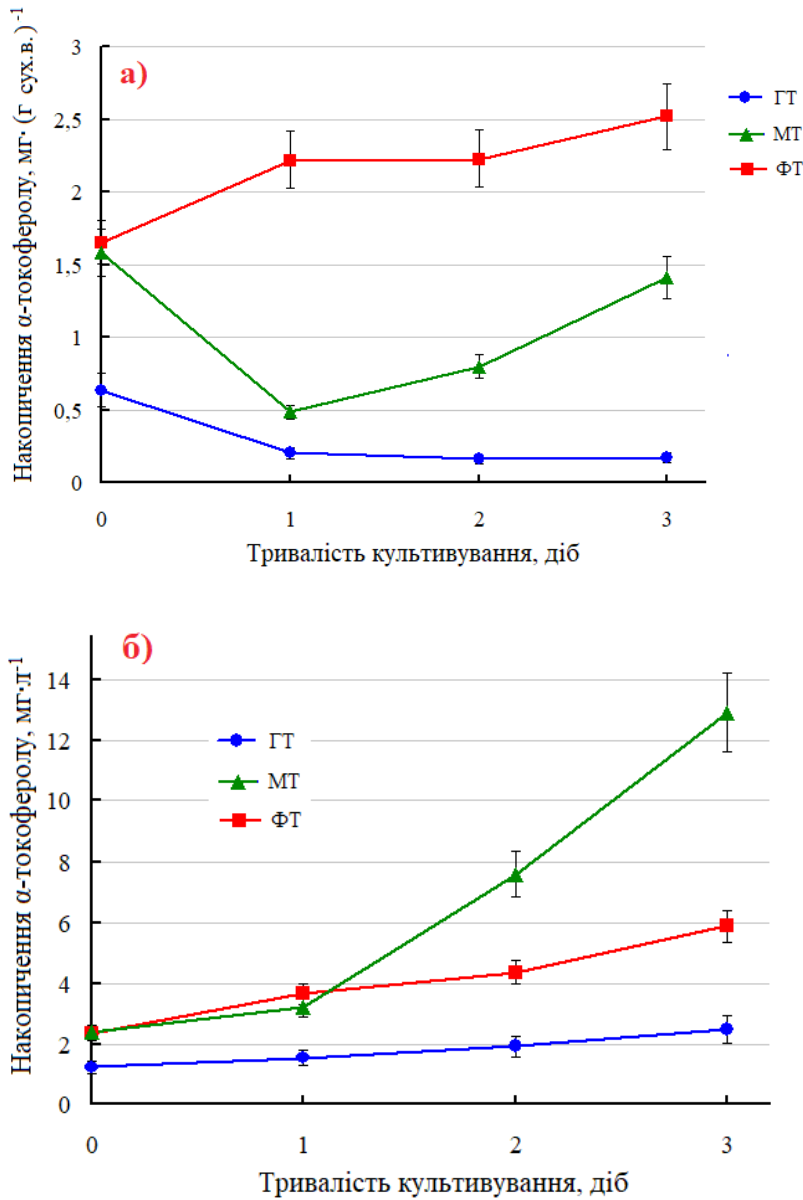


Рис. 2. Динаміка накопичення α -токоферолу у клітинах мікробіоцелу *E. gracilis* var. *saccharophila* за різних режимів культивування. Концентрація α -токоферолу представлена у: а) $\text{мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$; б) $\text{мг} \times \text{л}^{-1}$. Графіки побудовані за даними роботи [13]

Fig. 2. Dynamics of α -tocopherol accumulation in the cells of microalga *E. gracilis* var. *saccharophila* under different regimes of cultivation. The concentration of α -tocopherol is presented in: a) $\text{mg} \times (\text{g dry w.})^{-1}$; b) $\text{mg} \times \text{l}^{-1}$. Graphs are based on the data of [13]

Важливо підкреслити, що незважаючи на меншу концентрацію α -токоферолу в клітинах, його накопичення в перерахунку на літр культури було найвищим в МТ- культурах після 72 год вирощування (рис. 2б). Це пов'язано з більш інтенсивним ростом культури за МТ- умов. Такий же висновок був зроблений за результатами нашої роботи [22] при порівнянні накопичення α -токоферолу в ФТ- і МТ- культурах *E. gracilis*, вирощених при додаванні 100 мМ етанолу і 40 мМ глутамату. За цих умов загальний вихід α -токоферолу в МТ- культурі більше ніж вдвічі перевищував продукування цього вітаміну ФТ- культурою, хоча його вміст в перерахунку на клітину за МТ- умов був в 2–7 разів нижче ніж при ФТ- культивуванні.

Здатність деяких мікрободоростей (*Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis suecica*, *E. gracilis* та ін.) до гетеротрофного живлення може спрощувати культивування потенційного продуцента α -токоферолу за рахунок стимуляції росту культури органічними субстратами та синтезу α -токоферолу без освітлення [4]. У експериментах J. Ogbonna та ін. [26], акумуляція біомаси *E. gracilis* при ГТ культивуванні за присутності етанолу у сольовому живильному середовищі зростала до $39,5 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 19-у добу культивування, що перевищувало продуктивність як ФТ-, так і МТ- культур. Швидкість накопичення α -токоферолу в цих дослідях складала $102,1 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$. Метаболізм етанолу у клітинах мікрободорості супроводжується утворенням ацетил-КоА, який може виступати попередником синтезу токоферолів. На думку авторів, активація синтезу токохроманолів є наслідком помірною оксидативного стресу, який індукується в клітинах *E. gracilis* продуктом розщеплення етанолу – ацетальдегідом. Важливо також, що за наявності етилового спирту знижується ймовірність контамінації культури мікрободорості іншими мікроорганізмами.

Таким чином, гетеротрофні культури мікрободорості *E. gracilis*, які не залежать від освітлення, можуть бути перспективними комерційними продуцентами активного вітаміну Е і бути вигідною заміною нинішнім природним комерційним його джерелам – оліям [26].

Внутрішньоклітинний вміст α -токоферолу в клітинах водоростей залежить від умов культивування, отже, основним способом збільшення вмісту цього вітаміну є зміна складу живильного середовища, температурного та світлового режимів. Синтез токоферолів у клітинах мікрободорості *E. gracilis* можна стимулювати внесенням екзогенних субстратів (етанол, глюкоза, глутамат, малат та ін.) та їх комбінацій [3, 9, 26]. Відповідно до даних, отриманих T. Fujita та ін. [9] внесення однієї лише глюкози у живильне середовище культури *E. gracilis* стимулює накопичення клітин культури в 5 разів, але етанол є найкращим субстратом для стимуляції акумуляції α -токоферолу у перерахунку на одиницю об'єму культурального середовища.

Комбінація глюкози та етанолу у співвідношенні 3:2 забезпечує продуктивність α -токоферолу на культуру $38,9 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$, що більше ніж в 4 рази перевищувала швидкість накопичення α -токоферолу без екзогенного додавання джерел органічного вуглецю ($9,2 \times 10 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$). Культивування *E. gracilis* з підкормкою у біореакторі з внесенням суміші субстратів кожні 24 год після перших 48 год до 120 год культивування дозволяє підвищити продукування α -токоферолу до $162,7 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1} \times \text{год}^{-1}$ [9].



Як речовини-стимулятори синтезу токоферолів у клітинах мікроводорості *Stichococcus bacillaris* siva 2011 (Chlorophyta) використовували метилжасмонат [33]. Жасмонати синтезуються у клітинах рослин у відповідь на стреси та підвищують активність експресії деяких генів, залучених у захисні механізми рослинного організму. Один із таких генів кодує тирозин амінотрансферазу, яка бере участь у біосинтезі токоферолів. Дослідниками був проаналізований вплив різних концентрацій метилжасмонату у живильному середовищі *S. bacillaris* (50, 100 та 200 мкл), з-поміж яких найменша концентрація мала найбільш виражений вплив на продукування вітаміну Е. На 24-у годину культивування *S. bacillaris* у біореакторі за наявності 50 мкл жасмонату рівень RRR- α -токоферолу у клітинах організму зростав на ~50% порівняно із контрольним варіантом, досягаючи $1,3 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$. Цитотоксична дія більших концентрацій метилжасмонату та триваліший період експозиції негативно впливали на інтенсивність синтезу токоферолів [33].

Вплив світла і температури на продукування токоферолу мікроводоростями

Біосинтез α -токоферолу відбувається лише в фотосинтезуючих організмах [35], але літературні повідомлення щодо локалізації α -токоферолу у клітинах та його відношення до фотосинтезу є суперечливими [17, 23, 32, 34]. Вважається, що мітохондрії, так як і хлоропласти беруть участь в синтезі α -токоферолу [17, 31]. Утворення токоферолів відбувається у темряві при ГТ-культивуванні [28]. α -Токоферол накопичується також у позбавлених хлорофілу штаммах *E. gracilis* [29], при чому його біосинтез навіть стимулюється світлом [17]. Порівняльне дослідження вмісту α -токоферолу в мутанті *E. gracilis* (WZSL), не здатному до фотосинтезу, та дикому типі за фотогетеротрофних та гетеротрофних умов показали значне збільшення на світлі (майже на 100%) вмісту цього вітаміну в обох штаммах, незалежно від наявності хлоропластів. Тобто, кореляція між освітленням та виробленням вітаміну Е не пов'язана з фотосинтезом.

Експериментальне вивчення впливу інтенсивності освітлення і температури на накопичення α -токоферолу у різних видів фітопланктонних водоростей показало широкий діапазон реакцій [14]. За високої щільності потоку фотонів при підвищенні температури від 5°C до 25°C концентрації α -токоферолу поступово збільшувалися у *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyta) та *Prorocentrum cordatum* (Dinophyta). У всіх випадках, коли було зафіксовано значний вплив щільності потоку фотонів, також спостерігалася залежність продукування α -токоферолу від температури та/або комбінований ефект із температурою, за винятком штаму *D. tertiolecta* (Chlorophyta). Вміст α -токоферолу у цьому штамі зростав за високої щільності потоку фотонів незалежно від температури. Накопичення вітаміну в клітинах *Nodularia spumigena* (Cyanophyta), навпаки, посилювалося при низькій щільності потоку фотонів незалежно від температури. У багатьох випадках ці реакції виявляли подібні або протилежні закономірності щодо концентрацій антиоксидантів. Недавні дослідження показали, як забезпечення світлом або органічним вуглецем



впливає на вироблення розчинних у ліпідах клітинних компонентів, таких як α -токоферол [12, 39].

Слід відмітити, що у вищих рослин токофероли відіграють важливу роль в адаптації до стресів при низьких і високих температурах [19]. Відзначено вплив низької температури на вироблення токоферолу *E. gracilis* Z. Хоча в перші кілька годин низькотемпературного впливу спостерігалось незначне зниження вироблення α -токоферолу, його накопичення значно посилювалося протягом періоду адаптації (приблизно 50 год.), а після 100 годин стресу концентрація приблизно в 11 разів перевищувала контрольне значення [28].

Стимуляція синтезу α -токоферолу за умов помірного стресу

При ФТ- та МТ- культивуванні в первинних фотохімічних реакціях, які відбуваються у фотосинтетичних мембранах, утворюється велика кількість O_2 і активних форм кисню (АФК). Крім того, АФК виробляються у плазматичній мембрані, електрон-транспортною системою в мітохондріях [32], а також в ході інших метаболічних процесів, локалізованих у різних клітинних компартментах. У природному середовищі водорості постійно піддаються впливу різних абіотичних стресів, що призводять до зростання вмісту АФК, які викликають окиснювальну деструкцію клітинних структур. Кожен вид мікроводоростей по-різному реагує на різні типи стресів, мобілізуючи через клітинні зв'язки захисні антиоксидантні системи рослини, до яких залучені неферментативні антиоксиданти, такі як каротини, флавоноїди і ліпофільні токофероли. Залежно від умов, вміст токоферолу може відрізнитися до семи разів в клітинах одного штаму. Ця адаптивна реакція на стрес використовується в біотехнологічних регламентах для комерційного вирощування мікроводоростей з підвищеним вмістом специфічних антиоксидантних сполук.

Дослідження О. Mudimu та співавт. [24] на 130 штаммах водоростей та ціанобактерій показали, що більш висока концентрація α -токоферолу в клітинах досягається під час стаціонарної фази росту і є найвищою за наявності лише чверті стандартної кількості азоту у вигляді нітрату в живильному середовищі. Разом з цим дослідники вказали на залежність кількості накопиченого вітаміну Е в мікроводоростях від таксономічної приналежності організму. Найменші кількості α -токоферолу були виявлені у представників класів Rhodophyta та Streptophyta [24] (табл. 2).

Дослідження морських планктонних водоростей як можливого джерела біомаси, багаті вітаміном Е, показало, що серед п'яти досліджуваних видів мікроводоростей (*T. suecica*, *D. tertiolecta*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* (Haptophyta), *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta), *Chaetoceros caletoceros* (Bacillariophyta) найбільшу кількість вітаміну Е накопичує *T. suecica* – морська одноклітинна зелена водорість, яка містить відносно велику кількість ліпідів і токоферолів. Вміст α -токоферолу в клітинах *T. suecica* досягає $6,3 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, що еквівалентно вмісту вітаміну Е в зародках кукурудзи [6].

Морську мікроводорість *Nannochloropsis oculata* (Ochrophyta) використовують в аквакультурі для живлення коловерток, яких розводять для годування мальків риб, креветок, крабів, мідій. При визначенні шляхів підвищення харчової цінності первинної стадії цього трофічного ланцюга було



Таблиця 2

Вміст α -токоферолу в клітинах мікрободоростей та ціанобактерій за оптимальних умов та з обмеженням вмісту нітрогену у середовищі (за даними О. Mudimu та співавт.) [24]

Table 2

The content of α -tocopherol in the cells of microalgae and cyanobacteria under optimal conditions and with limited nitrogen content in the environment (according to O. Mudimu et al.) [24]

Відділ	Клас	Вид мікрободорості	Концентрація α -токоферолу (мкг \times г ⁻¹) в стаціонарній фазі росту	
			За стандарт. умов	За нестачі нітрогену
Chlorophyta	Chlorophyceae	<i>Haematococcus pluvialis</i>	580,43	1179,91
		<i>Coccomyxa</i> sp.	663,86	1062,02
Heterokontophyta	Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oculata</i>	575,10	1445,66
		<i>Microchloropsis salina</i>	671,80	1094,19
Streptophyta	Klebsormidiophyceae	<i>Klebsormidium crenulatum</i>	92,47	-
		<i>Interfilum terricola</i>	47,90	-
Rhodophyta	Porphyridiophyceae	<i>Porphyridium purpureum</i>	43,45	89,54
		<i>P. sordidum</i>	61,68	-
Цяанобактерія	Cyanophyceae	<i>Synechocystis</i> sp.	173,67	-
		<i>Arthrospira maxima</i>	177,23	-

встановлено, що вміст токоферолу в клітинах *N. oculata* неухильно зростає з віком культури, що пов'язано з посиленням антиоксидантного захисту клітин при старінні. Дефіцит нітрогену – одного із ключових елементів метаболізму призводить до розвитку окиснювального стресу, що індукує синтез антиоксидантів.

Вивчення впливу різних концентрацій і форм азоту на накопичення антиоксидантів показало, що при зниженому рівні нітратів накопичення α -токоферолу в культурі *N. oculata* зростало [7]. Наявність нітратів у живильному розчині в концентрації 441 мкМ є стимулом для підвищення виходу токоферолу (до 2,33 мг \times (г сух. в.)⁻¹) з культури на пізній стаціонарній фазі росту. Вміст α -токоферолу був на 26% вищим порівняно з культурою, яка зростала в середовищі з подвійним вмістом нітратів. Важливо зазначити, що водорості на ранній стадії росту в середовищі живлення з такою ж кількістю нітрату (441 мкМ), містили на 59% меншу кількість вітаміну Е. На противагу вирощуванню на нітраті, присутність азоту у тих самих концентраціях в інших формах не мала аналогічного впливу на динаміку акумуляції вітаміну [7]. Доведено, що нітрат найбільше сприяє накопиченню α -токоферолу у клітинах мікрободорості, порівняно з нітритом, амонієм, сечовиною, взятими у концентрації, що відповідає однаковій кількості атомів азоту на літр живильного середовища [15].

Вплив азотного голодування поряд з ефектом високої концентрації NaCl та опромінення УФ-В на синтез антиоксидантів у мікрободорості *D. salina*



(Chlorophyta) вивчався Н. Abd El-baky [1]. Згідно з результатами, антиоксидантний захист у клітинах *D. salina*, вирощених в оптимальному живильному середовищі, збільшується під опроміненням УФ-В, а також при високій концентрації NaCl та дефіциті азоту. Механізми захисту включають прискорений синтез антиоксидантних компонентів, включаючи α -токоферол, концентрація якого досягла максимального рівня в $3,83 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ через сукупний вплив сольового стресу (16% NaCl) та дефіциту азоту (2,5 мМ) [1].

З іншого боку, за даними [11] на вміст α -токоферолу в *Chlorella vulgaris*, *P. tricornutum* та *T. suecica* позитивно впливало лише обмеження фосфатного живлення, тоді як продукування α -токоферолу *T. suecica* посилювалося в умовах, насичення поживними речовинами [4].

Перевагами мікроводоростей *D. tertiolecta* та *T. suecica* є їх невибагливість до середовища, здатність асимілювати органічні речовини та швидко накопичувати біомасу вище $70 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$. Через це ці культури широко використовуються в аквакультурі для годівлі риби та личинок молюсків. Порівняння інтенсивності росту та накопичення α -токоферолу у *D. tertiolecta* та *T. suecica* в експерименті E. Carballo-Cardenas et al. [4] несподівано показали, що при збільшенні щільності клітин та зменшенні доступності світла зростали як концентрація клітин у культурі, так як і вміст токоферолу в клітинах. Таким чином, експеримент не виявив очікуваного впливу високої інтенсивності світла на вміст токоферолів як антиоксидантів, що захищають фотосинтетичний апарат від фотоокиснювальних пошкоджень. Автори вважають, що отримані дані показують, що внутрішньоклітинний синтез токоферолу стимулювався не тільки інтенсивністю світла, але й старінням культури. Ці результати вказують на можливість отримання великої кількості α -токоферолу з культур мікроводоростей з високою щільністю клітин [4].

Показано, що накопичення токоферолу у змішаних культурах мікроводоростей *E. gracilis* і *Selenastrum capricornutum*, які є компонентами аквакультур судака та сома, зростало при виснаженні поживних речовин у водоймі [36]. При зниженні концентрації амонійного нітрогену на 98,9–99,5 та фосфату на 98,4–99,8% від початкового рівня вміст токоферолу в біомасі водоростей зростав до $877,2 \text{ мкг} \times \text{л}^{-1}$, що перевищує вимоги до корму для риб. Таким чином, водорості за варіювання умов вирощування можуть забезпечити потреби риб в біологічно-активних речовинах.

Оптимізація синтезу α -токоферолу за умов двостадійного культивування мікроводоростей

Ріст деяких видів водоростей (наприклад, евгленоїдних та зелених водоростей) можна оптимізувати для посиленого виробництва α -токоферолу [35], розділяючи у часі стадію накопичення біомаси і стадію стимуляції біосинтезу α -токоферолу. При двостадійному режимі культивування мікроводорості спочатку вирощують в оптимальних для росту умовах. Потім мікроводорості збирають та переводять на модифіковане середовище для подальшого культивування в стресових умовах, що посилює біосинтез токоферолу. Для підвищення продукування токоферолу застосовують також екзогенне додавання прооксидантів, таких як H_2O_2 [2].



Найбільш перспективним джерелом токоферолів вважаються представники роду *Euglena* spp., які накопичують цього вітаміну до $3,7 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ із вмістом α -токоферолу до 97% [28, 30]. Клітини мікроводорості *E. gracilis* також накопичують у великих кількостях і інші антиоксиданти, такі як β -каротин, вітамін С, глутатіон, а також поліненасичені жирні кислоти, всі 20 основних амінокислот та імуностимулювальний поліцукрид β -глікан (парамілон) [38]. Завдяки високій поживній цінності цього організму та нетоксичності, його застосовують як основний корм чи підкормку для тварин, він споживається людиною у вигляді біологічно активних добавок [24].

Мікроводорість *E. gracilis* здатна асимілювати різноманітні органічні джерела вуглецю (глюкоза, ацетат, глутамат, сукцинат, піруват, малат, етанол та ін.), досягаючи маси клітин культури від $10,8$ до $19,0 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 5-у добу культивування в середовищі з оптимальним комбінованим вмістом субстратів [29, 34]. Цей організм також добре росте в автотрофних і гетеротрофних умовах культивування, має широкий оптимум рН та температури росту, не надто вибагливий до інтенсивності освітлення, має пристосування до дефіциту кисню. Клітини мікроводорості *E. gracilis* позбавлені целюлозної клітинної стінки, що значно полегшує екстракцію токоферолів і, у випадку використання біомаси *E. gracilis* у їжу, вона легко засвоюється та асимілюється. Проте, у порівнянні з деякими іншими мікроводоростями, *Dunaliella* і *Spirulina*, культура *E. gracilis* легко контамінується мікроорганізмами, що швидко ростуть [25].

МТ- клітини *E. gracilis* досягають високих показників накопиченої біомаси за одиницю часу, проте з меншим вмістом антиоксидантних вітамінів ніж у ФТ- культури. Для ефективного продукування цих вітамінів було застосовано двостадійне культивування [34]. Після того, як клітини *E. gracilis* були вирощені у культурі з підкормкою, у фотогетеротрофних (або гетеротрофних) умовах, їх густина досягала $19 \text{ г} \times \text{л}^{-1}$ на 6 добу з вмістом вітаміну Е лише $0,85 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$. Наступне перенесення цих клітин у сольове живильне середовище і фототрофне культивування протягом 3 діб підвищувало вміст у клітинах вітаміну Е до $1,45 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, а β -каротину та вітаміну С до $3,41$ та $4,16 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$ відповідно. Водночас, такий же вміст зазначених сполук спостерігався в клітинах лише при фотоавтотрофному культивуванні. Система культивування з підкормкою у випадку двостадійного культивування є найбільш ефективною. Метод двостадійного культивування застосовували і до деяких інших водоростей. Так, наприклад, мікроводорість *D. tertiolecta* хоч і накопичує дещо більше токоферолів на клітину, проте фінальна концентрація клітин лишається невеликою, результатом чого є низький вихід вітаміну Е на одиницю об'єму культури, порівняно з культурою *E. gracilis*. Незважаючи на простоту вирощування і швидкий ріст, водорості *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Spirulina*, мають низький вміст вітаміну Е на клітину [34]. Застосування циклічної фотоавтотрофно-гетеротрофної системи культивування, за якої клітини протягом дня зростають фотоавтотрофно, а вночі гетеротрофно, дозволяє вирішити проблему втрати біомаси вночі та досягти тривалого росту культури в умовах циклів світло-темрява [25].

Акумуляція токоферолів у клітинах *E. gracilis* може бути значно підвищена при внесенні деяких сполук з-поміж широкого діапазону органічних



субстратів мікроводорості. Етанол є субстратом *E. gracilis*, який стимулює не тільки ріст культури та акумуляцію α -токоферолу, але і парамілону – запасного поліцукриду мікроводорості, який має біотехнологічне значення [26, 29]. Комбіноване внесення етанолу з іншими субстратами може стимулювати продуктивність культури. Найбільшу концентрацію α -токоферолу ($5,1 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) було отримано з використанням мутантного штаму *E. gracilis* з додаванням у середовище попередників синтезу α -токоферолу тирозину та гомогентизату (рис. 1) [35]. *E. gracilis* здатна акумулювати α -токоферол у набагато більшій концентрації, ніж насіння соняшника ($0,27 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) та сої ($0,2 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$) [29].

Вихід α -токоферолу з біомаси мікроводорості залежить не тільки від його внутрішньоклітинного вмісту, але і від способу екстракції вітаміну. J. Mendiola та ін. [21], які у низці вимірювань вмісту α -токоферолу у клітинах *Spirulina platensis* отримували результат всього лише $0,011\text{--}0,014 \text{ мг} \times (\text{г сух. в.})^{-1}$, змоделювали процес екстракції α -токоферолу рідким діоксидом вуглецю з метою виявлення найефективніших показників температури та тиску при екстракції. Параметри створеної J. Mendiola та ін. математичної моделі, оцінені із застосуванням множинної лінійної регресії, дозволяють розрахувати концентрацію токоферолів у екстрактах *S. platensis* як функцію значень тиску та температури екстракції. Оптимальні умови процесу екстракції, згідно статистичної програми, склали $83,3 \text{ }^\circ\text{C}$ та 362 бар і були експериментально перевірені. При дотриманні вказаних умов екстракції CO_2 у суперкритичному стані є теоретична можливість отримати концентрацію α -токоферолу $29,4 \text{ мг} \cdot (\text{г екстракту})^{-1}$, що перевищує його вміст у вихідній біомасі *S. platensis* у 12 разів [21].

α -Токоферол є природнім антиоксидантом необхідним для споживання людиною та тваринами. Природніми джерелами цього вітаміну є фотосинтезувальні організми. Вміст найбільш біологічно активної α -ізоформи токоферолів у клітинах рослин є невисоким, більше переважає γ -токоферол у оліях – основних джерелах вітаміну для людини. Через це досліджується можливість використання різноманітних підходів для підвищення накопичення α -токоферолу рослинами, включаючи генетичні, які дають найкращий результат. Проте, споживання трансгенних рослин не має популярності, а віддається перевага генетично не зміненому продуценту. Широка різноманітність напрямів використання біомаси мікроводоростей, в першу чергу, як джерела цінних біологічно активних та поживних сполук, звертає увагу і на можливість отримання вітаміну E із цих організмів. Ключовими чинниками є метаболічна пластичність, адаптивність, швидкий приріст біомаси мікроводоростей як продуцентів та можливість створення різноманітних контрольованих умов для їх вирощування. Низка досліджень вже було проведено з приводу підвищення вмісту α -токоферолу у клітинах мікроводоростей та встановлено важливість вибору виду мікроводорості з підбором до неї умов культивування для стимуляції накопичення вітаміну. Ці умови можуть бути відносно універсальними, так як помірний стрес, викликаний підвищенням інтенсивності освітлення та температури, солоністю, або опроміненням, дефіцит нітратів у живильному середовищі, присутність речовин-стимуляторів, або попередни-



ків синтезу токоферолів. Часто окремі види водоростей проявляють нетипову реакцію на умови стресу, тому може бути необхідність у підборі специфічних умов. Перспективний продуцент α -токоферолу *E. gracilis* має підвищений вміст цієї сполуки при вирощуванні у присутності етанолу, особливо у комбінації з іншими субстратами, що спостерігається як на світлі, так і у темряві. Помірні стресові чинники, наприклад, відхилення від оптимуму значень температури, інтенсивності освітлення та вмісту поживних речовин у середовищі, сприяють синтезу вітаміну, але пригнічують ріст культури, через що доцільним є гетеротрофне, або міксотрофне вирощування. Стадійність культивування дозволяє вирішити проблему низької інтенсивності накопичення біомаси в умовах стимуляції синтезу антиоксидантів та суттєво підвищити продуктивність культури.

В.М. Мокросноп, О.К. Золотарьова

Институт ботаники им. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ; тел.: +38(044) 234 12 59,
e-mail: membrana@ukr.net

АКУМУЛЯЦІЯ α -ТОКОФЕРОЛА В КЛІТКАХ МІКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Реферат

*До настоящего времени растительные масла являются основным природным источником витамина E. Среди соединений группы витамина E наибольшую биологическую активность имеет α -токоферол, содержание которого в растительных маслах относительно небольшой. Значительно более высокие концентрации α -токоферола (до 4–6 мг/г сух. в.) накапливают некоторые микроводоросли, такие как *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* и др. Из-за этого последнее время увеличился интерес к биотехнологии микроводорослей с целью получения сырья для производства витаминов. Накопление токоферолов в биомассе *E. gracilis* происходит наиболее эффективно в условиях миксотрофного культивирования.*

Растворимый в липидах α -токоферол является компонентом неэнзиматической антиоксидантной системы и выполняет функцию защиты клеточных мембран от активных форм кислорода. В результате многих исследований установлена зависимость уровня накопления α -токоферола от условий культивирования микроводорослей, включая интенсивность освещения, фотопериод, уровень азота, температуру, тип углеродного питания и др. При этом, стрессовые условия стимулируют накопление антиоксидантов в фотосинтезирующих организмах, но ограничивают нормальную скорость их роста. Проблема увеличения выхода токоферолов решается в системах двухэтапного культивирования через разделение во времени стадий накопления биомассы и стадии стимуляции биосинтеза α -токоферола. Увеличение содержания токоферола при этом достигается благодаря введению экзогенных источников углерода на этапе накопления биомассы и лимитирование питательной среды по некоторым биогенным элементам на этапе стимуляции синтеза антиоксиданта. В обзоре приведены данные о влиянии



состава питательной среды, типа питания, температуры, интенсивности освещения, техники культивирования на накопление клетками микроводорослей витамина E.

Ключевые слова: микроводоросли, α -токоферол, двухэтапное культивирование

V.M. Mokrosnop, E.K. Zolotareva

M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
Tereshchenkivska str., 2, 01004, Kyiv; tel.: +38(044) 23412 59,
e-mail: membrana@ukr.net

ACCUMULATION OF α -TOCOPHEROL IN MICROALGAE CELLS

*To date, the main natural source of vitamin E is vegetable oils. Among the compounds of the vitamin E group, α -tocopherol has the higher biological activity, the relative content of which in vegetable oils is comparatively small. Significantly higher concentrations of α -tocopherol (up to 4-6 mg / g dry weight) accumulate some microalgae, such as *Euglena gracilis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* and others. Due to this, there has been a growing interest in biotechnology of microalgae as a raw material for the production of vitamins. The largest amount of tocopherols is synthesized in *Euglena gracilis* cells by myxotrophic cultivation.*

Lipid-soluble α -tocopherol is a component of the non-enzymatic antioxidant system and performs the function of protecting cell membranes from reactive oxygen species and free radicals. As a result of many studies, the dependence of the level of α -tocopherol accumulation on the conditions of cultivation of microalgae, including light intensity, photoperiod, nitrogen level, temperature, type of carbon nutrition, etc. At the same time, stressful conditions stimulate the accumulation of antioxidants in photosynthetic organisms, but limit the normal rate of their growth. The problem of increasing the yield of tocopherols is solved in systems of two-stage cultivation through the separation in time of the stage of biomass accumulation and the stage of stimulation of α -tocopherol biosynthesis. The increase in tocopherol content is achieved due to the introduction of exogenous carbon sources at the stage of biomass accumulation and limiting the nutrient medium for some nutrients at the stage of stimulating the synthesis of antioxidants. The review presents data on the effects of the composition of the nutrient medium, type of nutrition, temperature, light intensity, cultivation technique on the accumulation of vitamin E by microalgae cells.

Keywords: microalgae, α -tocopherol, two-stage cultivation



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Abd El-baky H.H., El Baz F.K., El-Baroty G.S.* Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina* // *Int. J. Agric. Biol.* – 2004. – Vol. 6. – P. 49–57.
2. *Abd El-Baky H.H., El Baz F.K., El-Baroty G.S.* Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress // *Acta Physiol. Plant.* – 2009. – Vol. 31. – P. 623–631.
3. *Afiukwa C.A., Ogbonna J.C.* Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis* // *Afr. J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 6. – P. 2612–2615.
4. *Carballo-Cárdenas E. C., Tuan P. M., Janssen M., Wijffels R. H.* Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation // *Biomol. Eng. J.* – 2003. – Vol. 20. – P. 139–147.
5. *Čamagajevac I. Š., Pfeiffer T. Ž., Maronić D. Š.* Abiotic stress response in plants: the relevance of tocopherols // *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants 2018.* (pp. 233-251). Springer, Cham.
6. *De Roeck-Holtzhauer Y., Quere I., Claire C.* Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga // *J. Appl. Phycol.* – 1991. – Vol. 3. – P. 259–264.
7. *Durmaz Y.* Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation // *Aquaculture.* – 2007. – Vol. 272. – P. 717–722.
8. *Fritsche S., Wang X., Jung C.* Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops // *Antioxidants.* – 2017. – Vol. 6. – P. 1–18.
9. *Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J.C., Tanaka H.* Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. – Vol. 79. – P. 371–378.
10. *Gissibl A., Sun A., Care A., Nevalainen H., Sunna A.* Bioproducts from *Euglena gracilis*: Synthesis and applications // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 7. – P. 108.
11. *Goiris K., Van Colen W., Wilches I., León-Tamariz F., De Cooman L., Muylaert K.* Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae // *Algal res.* – 2017. – Vol. 7. – P. 51–57.
12. *Grimm P., Risse J.M., Cholewa D., Müller J.M., Beshay U., Friehs K., Flaschel E.* Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion // *J. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 215. – P. 72–79.
13. *Hasan M.T., Sun A., Mirzaei M., Te'o J., Hobba G., Sunna A., Nevalainen H.* A comprehensive assessment of the biosynthetic pathways of ascorbate, α -tocopherol and free amino acids in *Euglena gracilis* var. *saccharophila* // *Algal res.* – 2017. – Vol. 27. – P. 140–151.
14. *Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijjs P.* Abiotic stress modifies the



- synthesis of alphanatocopherol and beta-carotene in phytoplankton species // J. Phycol. – 2014. – Vol. 50. – P. 753–759.
15. Herrero C., Abalde J., Fábregas J. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources // Bioresour. Technol. – 1991. – Vol. 38. – P. 121–125.
 16. Kottuparambil S., Thankamony R.L., Agusti S. *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review // Algal Res. – 2019. – Vol. 37. – P. 154–159.
 17. Kusmic C., Barsacchi R., Barsanti L., Gualtieri P., Passarelli V. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL // J. Appl. Phycol. – 1998. – Vol. 10. – P. 555–559.
 18. López-Hernández J.F., García-Alamilla P., Palma-Ramírez D., Álvarez-González C.A., Paredes-Rojas J.C., Márquez-Rocha F.J. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – P. 41–71.
 19. Maeda H., Song W., Sage T. L., Della Penna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis* // The Plant Cell. – 2016. – Vol. 18. – P. 2710–2732.
 20. Marquardt D., Williams J. A., Kučerka N., Atkinson J., Wassall S. R., Katsaras J., Harroun T. A. Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E // J. Amer. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 135. – P. 7523–7533.
 21. Mendiola J.A., García-Martínez D., Rupérez F.J., Martín-Álvarez P.J., Reglero G., Cifuentes A., Barbas C., Ibanez E., Señoráns F. J. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE // J. Supercrit. Fluids. – 2008. – Vol. 43. – P. 484–489.
 22. Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K., Polishchuk O.V. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions // Appl. Biochem. Microbiol. – 2016. – Vol. 52. – P. 216–221.
 23. Mokrosnop V. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms // Ukr. Biochem. J. – 2016. – Vol. 86. – P. 26–36.
 24. Mudimu O., Koopmann I. K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production // J. Appl. Phycol. – 2017. – Vol. 29. – P. 2867–2875.
 25. Ogbonna, J.C. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. – Vol. 84. – P. 217–225.
 26. Ogbonna J.C., Tomiyama S., Tanaka H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis* // J. Biotechnol. – 1999. – Vol. 70. – P. 213–221.
 27. O'Neill E.C., Trick M., Hill L., Rejzek M., Dusi R.G., Hamilton C.J., Zimba P.V., Henrissat B., Field R.A. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry // Mol. Biosyst. – 2015. – Vol. 11. – P. 2808–2820.



28. *Ruggeri B.A., Gray R.J., Watkins T.R., Tomlins R.I.* Effects of low-temperature acclimation and oxygen stress on tocopherol production in *Euglena gracilis* Z // *Appl. Environment. Microbiol.* – 1985. – Vol. 50. – P. 1404–1408.
29. *Rodríguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G., Moreno-Sánchez R.* Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production // *J. Appl. microbiol.* – 2010. – Vol. 109. – P. 2160–2172.
30. *Sakuragi Y., Maeda H., DellaPenna D., Bryant D.A.* α -Tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 141. – P. 508–521.
31. *Santiago-Morales I.S., Trujillo-Valle L., Márquez-Rocha F.J., López-Hernández J.F.L.* Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae: As Potential Food Antioxidants // *Appl. Food Biotechnol.* – 2018. – Vol. 5. – P. 19–27.
32. *Shigeoka S., Onishi T., Nakano Y., Kitaoka, S.* The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis* // *Agricult. Biol. Chem.* – 1986. – Vol. 50. – P. 1063–1065.
33. *Sivakumar G., Jeong K., Lay J.O.* Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva 2011 in a balloon bioreactor // *Microb. cell factories.* – 2014. – Vol. 13. – P. 79.
34. *Takeyama H., Kanamaru A., Yoshino Y., Kakuta H., Kawamura Y., Matsunaga T.* Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. // *Biotechnol. bioeng.* – 1997. – Vol. 53. – P. 185–190.
35. *Tani Y., Tsumura H.* Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. // *Agricult. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 53. – P. 305–312.
36. *Tossavainen M., Lahti K., Edelmann M., Eskola R., Lampi A. M., Piironen V., Korvonen P., Ojala A., Romantschuk M.* Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols // *J. Appl. Phycol.* – 2017. – Vol. 31. – P. 1753–1763.
37. *Valentin H.E., Qungang Q.* Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 68. – P. 436–44.
38. *Vismara R., Vestri S., Kusmic C., Barsanti L., Gualtieri P.* Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae // *J. Appl. Phycol.* – 2003. – Vol. 15. – P. 75–80.
39. *Wang Y., Seppänen-Laakso T., Rischer H., Wiebe M.G.* *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions // *PLoS ONE.* – 2018. – Vol. 13: e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>
40. *Yuan P., Cui S., Liu Y., Li J., Du G., Liu L.* Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 104. – P. 935–951.



REFERENCES

1. Abd El-baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. Int. J. Agric. Biol. 2004; 6: 49-57.
2. Abd El-baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS. Enhancement of antioxidant production in *Spirulina platensis* under oxidative stress // Acta Physiol. Plant. 2009; 31: 623–631.
3. Afiukwa CA, Ogbonna JC. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6: 2612-2615.
4. Carballo-Cárdenas EC, Tuan PM, Janssen M, Wijffels RH. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. Biomol. Eng. J. 2003; 20(4-6): 139-147.
5. Čamagajevac IŠ, Pfeiffer TŽ, Maronić D Š. Abiotic stress response in plants: the relevance of tocopherols. In Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants (pp. 233-251). 2018. Springer, Cham.
6. De Roeck-Holtzhauer Y, Quere I, Claire C. Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. J. Appl. Phycol. 1991; 3(3): 259-264.
7. Durmaz Y. Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture. 2007; 272: 717-722.
8. Fritsche S., Wang X., Jung C. Recent advances in our understanding of tocopherol biosynthesis in plants: an overview of key genes, functions, and breeding of vitamin E improved crops. Antioxidants. 2017; 6(4): 99.
9. Fujita T, Aoyagi H, Ogbonna JC, Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008; 79(3):371-378.
10. Gissibl A, Sun A, Care A, Nevalainen H, Sunna A. Bioproducts from *Euglena gracilis*: Synthesis and applications. Front. Bioeng. Biotechnol. 2019; 7:108.
11. Goiris K, Van Colen W, Wilches I, León-Tamarizc F, De Cooman L, Muylaertb K. Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. Algal res. 2017; 7: 51-57.
12. Grimm P, Risse JM, Cholewa D, Müller JM, Beshay U, Friehs K, Flaschel E. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. J. Biotechnol. 2015; 215: 72-79.
13. Hasan MT, Sun A, Mirzaei M, Te'o J, Hobba G, Sunna A, Nevalainen H. A comprehensive assessment of the biosynthetic pathways of ascorbate, α -tocopherol and free amino acids in *Euglena gracilis* var. *saccharophila*. Algal res. 2017; 27: 140-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.08.029>
14. Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. Abiotic stress modifies the synthesis of alpha- tocopherol and beta- carotene in phytoplankton species. J, phycol. 2014; 50(4):753-759.
15. Herrero C, Abalde J, Fábregas J. β -Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. Bioresour Technol. 1991; 38: 121-125.



16. Kottuparambil S, Thankamony RL, Agusti S. *Euglena* as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Res.* 2019; 37. P. 154-159.
17. Kusmic C, Barsacchi R, Barsanti L, Gualtieri P, Passarelli V. *Euglena gracilis* as source of the antioxidant vitamin E. Effects of culture conditions in the wild strain and in the natural mutant WZSL. *J. Appl. Phycol.* 1998; 10 (6):555-559.
18. López-Hernández JF, García-Alamilla P, Palma-Ramírez D, Álvarez-González CA, Paredes-Rojas JC, Márquez-Rocha FJ. Continuous microalgal cultivation for antioxidants production. *Molecules.* 2020; 25(18):41-71.
19. Maeda H, Song W, Sage TL., Della Penna D. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 2016; 18(10): 2710-2732.
20. Marquardt D, Williams JA., Kučerka N, Atkinson J, Wassall SR., Katsaras J, Harroun, TA. Tocopherol activity correlates with its location in a membrane: a new perspective on the antioxidant vitamin E. *J. Amer. Chem. Soc.* 2013; 135(20): 7523-7533.
21. Mendiola JA, García-Martínez D, Rupérez FJ, Martín-Álvarez PJ, Reglero G, Cifuentes A, Barbas C, Ibanez E, Señoráns FJ. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *J. Supercrit. Fluids.* 2008; 43(3):484-489.
22. Mokrosnop VM, Zolotareva EK, Polishchuk OV. Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* cells under autotrophic and mixotrophic culture conditions. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2016; 52. P. 216-221.
23. Mokrosnop V. Functions of tocopherols in the cells of plants and other photosynthetic organisms. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 86: 26-36.
24. Mudimu O, Koopmann IK, Rybalka N, Friedl T, Schulz R, Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on α -tocopherol production. *J. Appl. Phycol.* 2017; 29(6):2867-2875.
25. Ogbonna JC. Microbiological production of tocopherols: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 84(2):217-225.
26. Ogbonna JC, Tomiyama S, Tanaka H. Production of α -tocopherol by sequential heterotrophic-photoautotrophic cultivation of *Euglena gracilis*. *J. Biotechnol.* 1999; 70: 213-221.
27. O'Neill EC, Trick M, Hill L, Rejzek M, Dusi RG, Hamilton CJ, Zimba PV, Henrissat B, Field RA. The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Mol. BioSyst.* 2015; 11 (10):2808-2820.
28. Ruggeri BA, Gray RJ, Watkins TR, Tomlins RI. Effects of low-temperature acclimation and oxygen stress on tocopheron production in *Euglena gracilis*. *Z. Appl. Environm. Microbiol.* 1985; 50(6): 1404-1408.
29. Rodríguez-Zavala JS, Ortiz-Cruz MA, Mendoza-Hernández G, Moreno-Sánchez R. Increased synthesis of α - tocopherol, paramylon and tyrosine



- by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. J. Appl. Microbiol. 2010; 109(6): 2160-2172.
30. Sakuragi Y, Maeda H, Della Penna D, Bryant DA. α -Tocopherol plays a role in photosynthesis and macronutrient homeostasis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 that is independent of its antioxidant function. Plant Physiol. 2006; 141: 508–521.
 31. Santiago-Morales IS, Trujillo-Valle , Márquez-Rocha FJ, López-Hernández JF. Tocopherols, Phycocyanin and Superoxide Dismutase from Microalgae: As Potential Food Antioxidants. Appl. Food Biotechnol. 2018; 5, 19–27.
 32. Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S. The contents and subcellular distribution of tocopherols in *Euglena gracilis*. Agricult. Biol. Chem. 1986; 50(4): 1063-1065.
 33. Sivakumar G, Jeong K, Lay JO. Biomass and RRR- α -tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor. Microb. cell factories. 2014; 13(1):79.
 34. Takeyama H, Kanamaru A, Yoshino Y, Kakuta H, Kawamura Y, Matsunaga T. Production of antioxidant vitamins, β -carotene, vitamin C, and vitamin E, by two- step culture of *Euglena gracilis* Z. Biotechnol. Bioeng. 1997; 53(2):185-190.
 35. Tani Y, Tsumura H. Screening for tocopherol-producing microorganisms and α -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. Agricult. Biol. Chem. 1989; 53(2), 305-312.
 36. Tossavainen M, Lahti K, Edelmann M, Eskola R, Lampi A. M, Piironen V, Korvonen P, Ojala A, Romantschuk M. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. J. Appl. Phycol. 2017; 31(3): 1753-1763.
 37. Valentin HE, Qungang Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005; 68: 436-444.
 38. Vismara R, Vestri S, Kusmic C, Barsanti L, Gualtieri P. Natural vitamin E enrichment of *Artemia salina* fed freshwater and marine microalgae. J. Appl. Phycol. 2003; 15(1): 75-80.
 39. Wang Y, Seppänen-Laakso T, Rischer H, Wiebe MG. *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. PLoS ONE. 2018; 13(4): e0195329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>
 40. Yuan P, Cui S, Liu Y, Li J, Du G, Liu L. Metabolic engineering for the production of fat-soluble vitamins: advances and perspectives. Applied Microbiol. Biotechnol. 2019; 104(3):935-951.

Стаття надійшла до редакції 27.01.2021 р.



В.М. Засць, Л.А. Коломієць, О.Ю. Цуварєв, О.І. Корнелюк

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка

Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна,

тел.: +38 (044) 526 55 89, e-mail: v.n.zayets@gmail.com

ВИДІЛЕННЯ ТА АНАЛІЗ СТРУКТУРИ МУТАНТНОЇ ФОРМИ N-КІНЦЕВОГО КАТАЛІТИЧНОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ *BOS TAURUS* З ЗАМІНОЮ Trp 40 ТА Trp 87 НА АЛАНІН

Мета. Виділення та аналіз структури мутантного одотриптофанового білка міні *BtTyrRS* для дослідження за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента в процесі взаємодії з антикодоном тРНК та визначення впливу залишків триптофану в положенні 40 та 87 в його структурі на функціональні властивості ензиму. **Методи.** Електрофорез, метал-хелатувальна афінна хроматографія, флуоресцентна спектроскопія, моделювання просторової структури. **Результати.** Встановлено, що заміна двох кодонів амінокислоти триптофану на кодони амінокислоти аланіну в клонованій кДНК міні *BtTyrRS* не впливає на синтез мутантної форми фермента в штамі *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Вихід афінно очищеного на Ni-NTA агарозі білка складає в середньому 3,5 мг з 100 мл культурального середовища. Комп'ютерне моделювання структури та флуоресцентна спектроскопія одотриптофанової форми міні *BtTyrRS* вказують на компактну структуру мутантного фермента, в якому Trp 283 знаходиться в іммобілізованому мікрооточенні. **Висновки.** Отримано афінно очищений на Ni-NTA агарозі мутантний одотриптофановий білок міні *TyrRS*, придатний для флуоресцентних досліджень структурно-динамічних та функціональних властивостей ензиму.

Ключові слова: тирозил-тРНК синтетаза, мутанта форма міні *TyrRS*, бактеріальна експресія

Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) [КФ 6.1.1] є ключовим ферментом першого етапу білкового синтезу. АРСази каталізують високоселективну АТФ-залежну активацію амінокислоти з утворенням аміноациладенілата та ковалентне приєднання її до ізоакцепторної тРНК, здійснюючи таким чином першу стадію реалізації закодованої в геномі організмів інформації про структуру білка [1].

Тирозил-тРНК синтетаза (*TyrRS*) є однією з найбільш вивчених АРСаз. В клітинах ссавців вона є гомодимером $\alpha 2$ типу, мономером якого є повнорозмірний фермент. Мономер *TyrRS* *Bos taurus* (59.2 кДа) складається з N-кінцевого каталітичного (міні *BtTyrRS*, 39 кДа) та C-кінцевого ЕМАР II-подібного (20кДа) модулів [2]. В *BtTyrRS* N-кінцевому модулю притаманна каталітична



функція аміноацилювання тРНК, тоді як С-модуль відповідає за корегування та стабілізацію розміщення тРНК в активному центрі фермента [2,3]. Крім основної функції аміноацилювання тРНК тирозил-тРНК синтетаза виконує в клітині і важливі неканонічні функції. Після розщеплення синтетази еластазою на міні *BtTyrRS* та С-модуль, останні проявляють цитокінові властивості: міні *TyrRS* є інтерлейкін-подібним цитокіном і стимулює ангиогенез, активує міграцію ендотеліальних клітин, а також є хемотаксичним фактором для нейтрофілів, тоді як С-модуль є ЕМАР II подібним цитокіном і стимулює хемотаксичну активність моноцитів та підсилює прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин [3,4].

З огляду на те, що N-кінцевий каталітичний модуль синтетази є інтерлейкін-подібним цитокіном і проявляє проангіогенні властивості, він є перспективним об'єктом для досліджень з метою можливого використання в подальшому як лікарського препарату.

Амінокислотна послідовність N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* має три залишки триптофану, які в структурі білка розташовані в активному центрі ферменту (W40), в області димеризації мономерів міні *BtTyrRS* (W87) та в сайті зв'язування триплету антикодону тРНК *TyrRS* (W283). Розташування залишків триптофану в функціонально важливих областях ензиму робить перспективним дослідження його властивостей методами флуоресцентної спектроскопії, оскільки флуоресцентна спектроскопія є одним з найбільш інформативних методів вивчення конформаційних особливостей і внутрішньомолекулярних взаємодій в структурі білків [5]. Найбільш інформативними флуоресцентні дослідження властивостей білків стають при наявності лише одного залишка триптофану в їх структурі.

Раніше нами було клоновано кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази в експресуючій плазміді pET32a та досліджено його експресію [6]. В подальшому за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу в клонованій кДНК міні *BtTyrRS* було заміщено кодони Trp40 та Trp87 на кодони аланіну і залишено лише один кодон триптофану в області зв'язування ферментом антикодону [7].

Метою даної роботи було виділення та аналіз структури мутантного однотриптофанового білка міні *BtTyrRS* для дослідження в подальшому за допомогою методів флуоресцентної спектроскопії конформаційних змін фермента в процесі взаємодії з антикодоном тРНК та визначення впливу залишків триптофану в положенні 40 та 87 в його структурі на функціональні властивості ензиму.

Матеріали і методи

В роботі була використана бактеріальна система *E. coli*, оскільки експресія білків в *E. coli* є недорогим, простим і швидким методом, який дозволяє отримати рекомбінантні білки у великих кількостях в нативному стані [8,9]. Для отримання мутантної форми міні *TyrRS* було взято штам-продуцент рекомбінантного білка *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* (Stratagene, США), трансформований плазмідною конструкцією pET30a-39KYRSW283. Експресуюча конструкція pET30a-39KYRSW283 була створена на базі вектору pET-30a(+)



(“Novagen”, США) і містила клоновану мутантну по кодонам триптофанів в положенні 40 та 87 кДНК міні *BtTyrRS*.

Для напрацювання рекомбінантної плазмиди pET30a-39KYRSW283 використовували генноінженерний штам *E. coli* DH5 α . Плазмідну ДНК виділяли за допомогою кіта Gene JET Plasmid Miniprep Kit фірми “Thermo Scientific”. Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”). Компетентні клітини *E. coli* отримували згідно методу Іное [10]. Всі процедури з трансформації плазмідної конструкції pET30a-39KYRSW283 в компетентні клітини *E. coli* проводили стандартним методом згідно з лабораторним посібником [11].

Вирощування культури *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* та індукцію експресії рекомбінантної міні *BtTyrRS* в бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бергані (LB) (10 г бактотриптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl на 1 л) з 30 мкг/мл антибіотика канаміцину. Трансформовані рекомбінантною плазмідною pET30a-39KYRSW283 компетентні клітини *E. coli* вирощували на шейкері (Environmental Shaker Incubator ES-20) при 37 °C до оптичної густини A600 = 0,6–0,8 і індукували синтез цільового білка додаванням 1М ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозида (IPTG) до 1мМ концентрації з наступною інкубацією при 25 °C впродовж 12 годин згідно статті [12]. Зібрану біомасу зі 100 мл культури ресуспендували у 12 мл буферу для лізису клітин (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Лізис проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗ-озвучуванням (6 циклів по 20 с, інтервали 20 с). Лізат освітлювали центрифугуванням при 13000 об/хв протягом 30 хв при 4 °C. Супернатант наносили на врівноважену буфером для лізису клітин Ni-NTA агарозну колонку об’ємом 2 мл, яку промивали 10 мл буферу для промивки (50 мМ натрій-фосфатний буфер, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Рекомбінантний білок елюювали 5 мл буферу для елюції (50 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Фракції з елюйованим білком об’єднували і діалізували проти 300 мл буферу для діалізу (500 мМ натрій-фосфатний буфер рН 8,0, 150 мМ NaCl) впродовж 20 годин при + 4 °C.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка міні *BtTyrRS* визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі BioMate 5, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції 27850 M⁻¹ cm⁻¹ при довжині хвилі 280 нм. Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного складу білка за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Електрофоретичний аналіз експресії рекомбінантного білка проводили за допомогою електрофорезу в 12% поліакриламідному гелі в денатурувальних умовах в буферній системі Леммлі [13]. Гелі забарвлювали барвником Cumassie R250.

Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі з термостатованим кюветотримачем Hitachi M850 (Японія). Температуру у кюветі визначали з точністю до + 0,2 °C. Вимірювання проводили у кварцевій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілини для монохроматора збуджувального світла та реєструючої системи становила 5–10 нм.



Довжина хвилі збуджувального світла дорівнювала 280 нм та 295 нм, інтервал довжини хвиль для спектрів флюоресценції становив 300–400 нм, реєстрацію флюоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджувального світла при температурі 25 °С.

Амінокислотна послідовність TyrRS *Bos taurus* була взята з бази даних NCBI Gene data-base (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) за ідентифікаційним номером DAA32266.1. Просторові структури димера подвійного мутанта *Bt*TyrRS були змодельовані з кристалічної структури *Hs*TyrRS (коди PDB 1N3L:A) як матриці за допомогою веб-сервера SWISS-MODEL [14].

Результати та їх обговорення

В попередніх роботах нами була отримана, клонована в низці плазмідних векторів та секвенована повна нуклеотидна послідовність кДНК гену тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* [15]. На її основі була створена експресуюча конструкція рЕТ-30a(+)-39KYRS з клонованою послідовністю кДНК N-кінцевого каталітичного модуля синтетази. Експресований в штамі *E. coli* BL21 (DE3) рекомбінантний білок міні *Bt*TyrRS зберігав аміноацилювальну здатність, притаманну аміноацил-тРНК синтетази.

Базуючись на рентгенструктурних даних кристалів N-кінцевого каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази людини [16], яка на 95% схожа з міні TyrRS *Bos taurus*, і комп'ютерній моделі просторової структури повнорозмірної тирозил-тРНК-синтетази *Bos taurus* [17], нами була побудована комп'ютерна модель структурної організації гомодимера N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS *Bos taurus* [12]. Згідно з даними рентгенструктурного аналізу та створеної нами тривимірної моделі каталітичного модуля синтетази триптофанові залишки в положенні 283 в димері функціональної міні *Bt*TyrRS знаходяться в області, доступній для взаємодії з тРНК.

З метою отримання білка міні *Bt*TyrRS з одним залишком триптофану в положенні 283 для дослідження властивостей фермента методами флюоресцентної спектроскопії в плазмідній конструкції рЕТ-30a(+)-39KYRS була проведена заміна триплетів триптофану в кДНК каталітичного модуля синтетази в положенні 40 та 87 на триплети аланіну методом сайт-спрямованого QuikChange мутагенезу [7]. В результаті була отримана плазмідна конструкція рЕТ-30a(+)-39KYRS283W, що має лише один кодон триптофану в положенні 283 в клонованій послідовності кДНК N-кінцевого модуля синтетази. Амінокислота аланін була вибрана для заміщення залишків триптофану в амінокислотній послідовності міні *Bt*TyrRS за її невеликим гідрофобним радикалом, який не впливає на формування суміжними амінокислотними залишками в поліпептидному ланцюзі вторинної структури білка.

Для визначення впливу замін двох триптофанових залишків на аланін на структуру міні *Bt*TyrRS була побудована модель просторової структури мутантної форми гомодимера N-кінцевого каталітичного модуля TyrRS *Bos taurus* з одним триптофановим залишком в послідовності білка в положенні 283. Розроблена модель мутантної форми міні *Bt*TyrRS приведена на рис. 1. Порівняння моделей просторових структур отриманої раніше нативної [12] та мутантної форм міні *Bt*TyrRS не виявило явних відмінностей в їх структурі.



Це свідчить про те, що заміна Trp40 та Trp87 на Ala в амінокислотній послідовності білка не привела до порушення просторової структури ензиму.

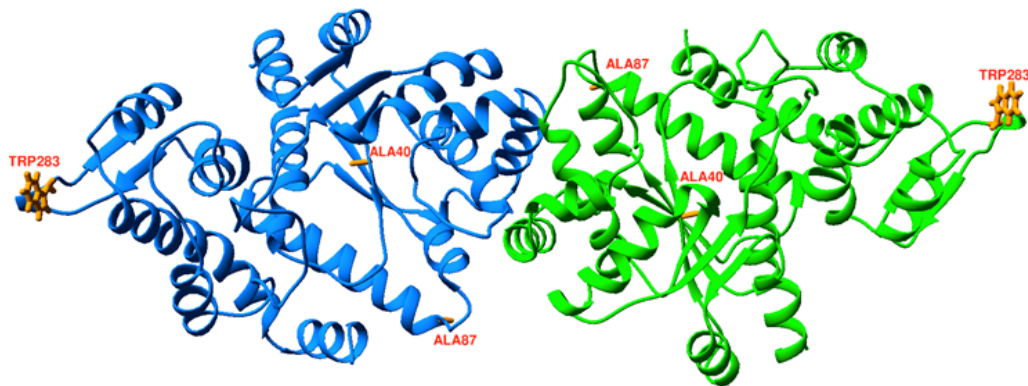


Рис. 1. Модель просторової структури гомодимера мутантної форми міні *BtTyrRS* з залишком триптофану в положенні 283. Різні мономери позначені синім та зеленим кольором

Fig.1. Model of spatial structure of the homodimer of mutant form mini *BtTyrRS* with tryptophan residues at position 283. Different monomers are highlighted in blue and green

Дослідження властивостей ферментів експериментальними методами потребує значної кількості білків. Для їх отримання в основному застосовуються генно-інженерні підходи. Бактеріальна система експресії на основі РНК-полімерази фага T7 є однією з найбільш ефективних прокариотичних систем, що використовується для отримання рекомбінантних білків як про-, так і еукаріотичного походження. Продуктом рекомбінантних білків в цій системі є штами на основі *E. coli* BL21(DE3), в яких ген РНК-полімерази фага T7 під контролем промотора lacUV5 інтегрований в бактеріальну хромосому. Штами на основі BL21(DE3) використовуються як реципієнти різних експресувальних плазмідних векторів, в яких цільові гени вбудовуються під контроль промоторів, що впізнаються РНК-полімеразою фага T7. До таких плазмідних векторів відноситься вектор рЕТ-30a(+). Транскрипція клонованих генів в цих векторах індуктується додаванням в культуральне середовище індуктора синтезу IPTG.

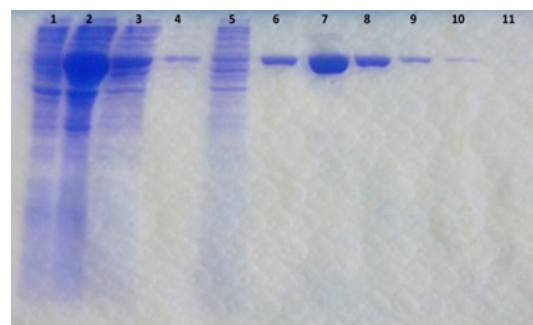
Синтез рекомбінантних білків в бактеріальних системах значною мірою залежить від умов культивування. В попередніх роботах нами були визначені оптимальні параметри експресії в бактеріальних клітинах *E. coli* штаму BL21(DE3)*pLysE* нативної повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази, нативної та мутантної міні *BtTyrRS*, в амінокислотній послідовності якої залишки Trp40 та Trp283 були замінені на залишки Ala [6, 12, 18]. В роботах досліджувався вплив на експресію міні *BtTyrRS* в експресувальному векторі рЕТ-30a(+) таких чинників, як склад культурального середовища, кількість індуктора синтезу білка, що вноситься в культуральне середовище, температурні параметри та час культивування культури до та після додавання індуктора. Було показано, що найбільш високий рівень синтезу рекомбінантної міні

BtTyrRS в культурі *E. coli* досягався при додаванні в культуральне середовище індуктора синтезу білка IPTG в концентрації 1мМ при досяганні оптичної густини $OD_{600} = 0,7-0,9$, що відповідає логарифмічній фазі росту бактеріальної культури, та інкубації культури впродовж 8 годин при 25 °С. При цій температурі інкубації бактеріальних культур відзначався найбільш високий вміст синтезованої рекомбінантної міні *BtTyrRS* в розчинній фракції клітин *E. coli*, який досягав 47% від загальної кількості синтезованого рекомбінантного білка. Було встановлено також, що склад культурального середовища не має значного впливу на експресію ферменту.

Експериментально встановлені оптимальні умови експресії каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* в *E. coli* в середовищі LB були враховані нами в роботі при отриманні препаративної кількості рекомбінантної мутантної міні *BtTyrRS* в культурі клітин *E. coli* штаму BL21(DE3) *pLysE* після трансформації штаму плазмідною конструкцією рЕТ-30a(+)-39KYRS283W.

Після лізису бактеріальних клітин та хроматографічної очистки лізату за допомогою металхелатувальної хроматографії на Ni-NTA агарозі (рис. 2) з 100 мл бактеріальної культури, інкубованої при температурі 25 °С впродовж 8 годин, було отримано з використанням при оцінці виходу білку коефіцієнта екстинції $27850 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ до 3,5 мг гомогенного рекомбінантного білка мутантної міні *BtTyrRS*, чистота якого згідно гель-електрофорезу досягає 95% (рис. 3).

Кількість отриманого білка мутантної форми міні *BtTyrRS* співвідноситься з кількістю отриманого раніше у культуральному середовищі в одних і тих же умовах білка нативної форми ферменту [12]. Це свідчить, що заміна двох триптофанових залишків на аланін в положенні 40 та 87 в структурі каталітичного модуля *BtTyrRS* не впливає на синтез рекомбінантного білка в трансформованому плазмідною конструкцією рЕТ-30a(+)-39KYRS283W штамі *E. coli* BL21(DE3)*pLysE*. Відповідно, з одного літра бактеріальної культури у використаних нами умовах експресії можна отримати до 35 мг очищеного рекомбінантного ензиму.



№	
1	Лізат до індукції
2	Лізат після індукції IPTG
3	Супернатант
4	Промивка
5	Проскок
6	6-10-фракції елюції
11	Змив

Рис 2. Електрофоретичний аналіз експресії та очистки мутантної форми mini-TyrRS на Ni-NTA агарозі

Fig. 2. Electrophoretic analysis of expression and purification of the mutant form of mini-TyrRS on Ni-NTA agarose



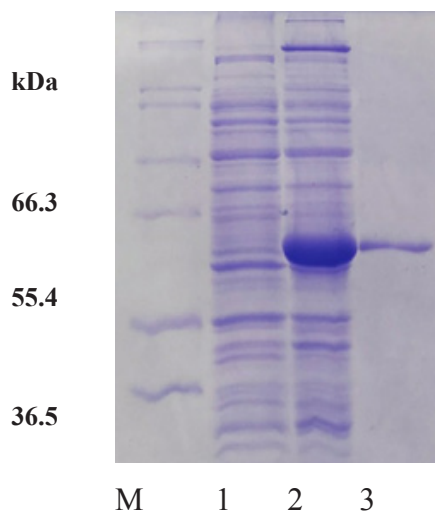


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз експресії мутантної форми каталітичного модуля тирозинової аміноацил-тРНК синтетази *Bos taurus* в штамі *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* та електрофоретичний контроль чистоти мутантного білка після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарози (12%-ий поліакриламідний гель)

М – Маркерна суміш білків (“Invitrogen”, Mark 12 Unstained Standart)

1 – Клітинний лізат трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW283 бактеріальної культури штаму BL21(DE3)*pLysE* до індукції IPTG синтезу мутантної форми міні *BtTyrRS*

2 – Клітинний лізат трансформованої плазмідною рЕТ30а-39KYRSW283 бактеріальної культури штаму BL21(DE3)*pLysE* після індукції IPTG синтезу мутантної форми міні *BtTyrRS*

3 – Мутантна міні *BtTyrRS* після хроматографічної очистки на Ni-NTA агарози

Fig. 3. Electrophoretic analysis of the expression of the mutant form of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase catalytic module in *E. coli* BL21(DE3) *pLysE* strain and electrophoretic control of the purity of the mutant protein after chromatographic purification on Ni-NTA agarose (12% polyacrylamide gel).

М – Mixture of marker protein ("Invitrogen", Mark 12 Unstained Standart).

1 – Cell lysate of bacterial culture of *E. coli* strain BL21(DE3)*pLysE* transformed with plasmid рЕТ30а-39KYRSW87 before IPTG induction of mutant mini *BtTyrRS* synthesis.

2 – Cell lysate of bacterial culture of *E. coli* strain BL21(DE3) *pLysE* transformed with plasmid рЕТ30а-39KYRSW40 after IPTG induction of mutant form mini *BtTyrRS* synthesis.

3 – Mutant mini *BtTyrRS* after chromatographic purification on Ni-NTA agarose.

Для оцінки стану отриманої за допомогою металхелатувальної хроматографії мутантної форми каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази була застосована флуоресцентна спектроскопія. Спектри флуоресценції мутантної форми каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *B. taurus* за довжини хвилі збудження 280 нм (спектр флуоресценції білка зумовлений сумарним випромінюванням тирозинових та триптофанового залишків) та 295 нм (спектр флуоресценції зумовлений випромінюванням лише триптофанового залишку) приведені на рис.4. Флуоресцентні характеристики емісії триптофанового залишку отриманого рекомбінантного білка, ширина спектра флуоресценції $\Delta\lambda$ та положення максимуму флуоресценції, становлять, відповідно, близько 57 нм та 345 нм (рис. 4). Параметри спектрів флуоресценції

триптофанових залишків залежать від полярності мікрооточення, а також їх здатності релаксувати за час життя флуоресценції. Полярність мікрооточення триптофанового залишку визначається як його доступністю для молекул розчинника, так і власними полярними групами білка, які входять до складу мікрооточення. Згідно моделі трьох спектральних класів залишків триптофану в структурі білків [19] триптофановий залишок в положенні 283 відноситься більшою мірою до спектрального класу II, що характеризується емісією іммобілізованого на поверхні білка індольного флуорофора, який в основному контактує зі зв'язаною водою та іншими полярними групами в структурі протеїну.

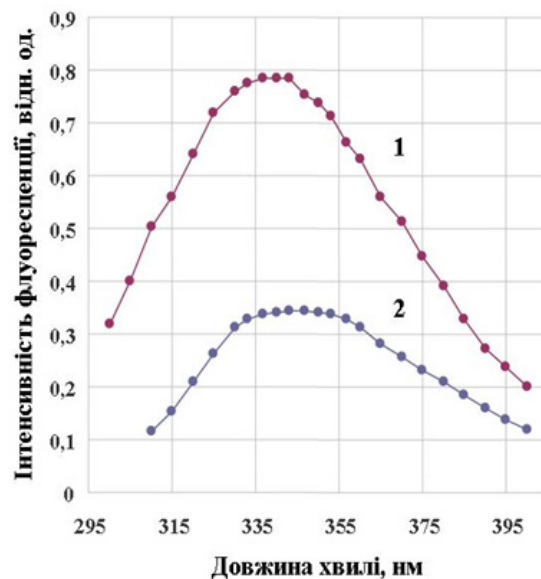


Рис. 4. Спектри флуоресценції мутантної форми міні TyrRS при довжині збудження 280 нм (1) та 296 нм (2)

Fig. 4. Fluorescence spectra of the mutant form of mini TyrRS at excitation wavelengths of 280 nm (1) and 296 nm (2)

Раніше нами була вивчена власна триптофанова флуоресценція нативної міні TyrRS і проаналізована її внутрішньомолекулярна динаміка методами флуоресцентної спектроскопії [20]. Проведений аналіз локалізації та властивостей мікрооточення 3-х триптофанових залишків, відповідальних за власну флуоресценцію міні TyrRS, дозволив охарактеризувати їх доступність в структурі димера фермента та конформаційну рухливість їх мікрооточення. Характеристики триптофанової флуоресценції мутантної форми міні TyrRS з залишками триптофанів у положенні 283 свідчать про іммобілізацію і компактний стан оточення триптофанових залишків в гомодимері ензиму та збереження нативної конформації синтетази.

Дані підтверджуються подібністю просторових структур нативної та мутантної форм міні *Bt*TyrRS та аналізом їх властивостей за допомогою програми ProtParam, згідно якої індекси нестабільності останніх майже однакові



і дорівнюють відповідно 36,2 та 37,15, що свідчить про стабільність рекомбінантного білка.

В результаті проведеної роботи встановлено, що заміна кодонів триптофану в положеннях 40 та 87 на кодони аланіну в кДНК каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази *Bos taurus* не впливає на синтез мутантної форми ферменту в клітинах *E. coli* та її структуру. Вихід очищеного гомогенного білка мутантної міні *BtTyrRS* при інкубації культури трансформованого плазмідом рЕТ30а-39KYRSW283 штаму *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* при 25 °С складає в середньому 35 мг з 1 л культурального середовища LB, що є достатнім для проведення подальших структурно-функціональних досліджень мутантної форми *BtTyrRS*. Згідно оцінки просторової структури та флуоресцентних даних структура мутантної форми синтетази перебуває в компактному стані.

V.N. Zayets, L.A. Kolomiets, O.Yu. Tsuvarev, A.I. Kornelyuk

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03143
v.n.zayets@gmail.com

ISOLATION AND STRUCTURE ANALYSIS OF THE MUTANT FORM OF N-TERMINAL CATALYTIC MODULE OF *BOS TAURUS* TYROSYL-tRNA SYNTHETASE WITH REPLACEMENT OF Trp 40 AND Trp 87 BY ALANINE

Summary

Aim. Isolation and analysis of the structure of the mutant monotryptophan protein mini *BtTyrRS* for study of conformational changes of the enzyme at the stage of interaction with tRNA using fluorescence spectroscopy and determination of the effect of tryptophan residues in position 40 and 87 in its structure on the functional properties of the enzyme. **Methods.** Electrophoresis, metal-chelating affinity chromatography, fluorescence spectroscopy, spatial structure modeling. **Results.** It was found that the replacement of two codons of Trp by codons of Ala in the cloned cDNA mini *BtTyrRS* does not affect the synthesis of the mutant form of the enzyme in *E. coli* strain BL21 (DE3) *pLysE*. The yield of affinity purified protein on Ni-NTA agarose is on average 3.5 mg per 100 ml of culture medium. Computer modeling of the structure and fluorescence spectroscopy of the monotryptophan form of mini *BtTyrRS* indicates a compact structure of the mutant enzyme, in which Trp 283 is in an immobilized microenvironment. **Conclusions.** Affinity purified on Ni-NTA agarose mutant monotryptophan protein mini *TyrRS* have been obtained which is suitable for fluorescent studies of structural-dynamic and functional properties of the enzyme.

Key words: tyrosyl-tRNA synthetase, mutant form of mini *TyrRS*, bacterial expression



В.Н. Заец, Л.А. Коломиец, А.Ю. Цуварев, А.И. Корнелюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ МУТАНТНОЙ ФОРМЫ N-КОНЦЕВОГО КАТАЛИТИЧЕСКОГО МОДУЛЯ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ *BOS TAURUS* С ЗАМЕНОЙ Trp 40 И Trp 87 НА АЛАНИН

Реферат

Цель. Выделение и анализ структуры мутантного одготриптофанового белка мини *VtTyrRS* для исследования с помощью методов флуоресцентной спектроскопии конформационных изменений фермента в процессе взаимодействия с тРНК и определения влияния остатков триптофана в положениях 40 и 87 в его структуре на функциональные свойства энзима. **Методы.** Электрофорез, металл-хелатирующая аффинная хроматография, флуоресцентная спектроскопия, моделирование пространственной структуры. **Результаты.** Установлено, что замена двух кодонов аминокислоты триптофана на кодоны аминокислоты аланина в клонированной кДНК мини *VtTyrRS* не влияет на синтез мутантной формы фермента в штамме *E. coli* BL21 (DE3) *rLysE*. Выход аффинно очищенного на Ni-NTA агарозе белка составляет в среднем 3,5 мг с 100 мл культуральной среды. Компьютерное моделирование структуры и флуоресцентная спектроскопия одготриптофановой формы мини *VtTyrRS* указывают на компактную структуру мутантного фермента, в которой Trp 283 находится в иммобилизованном микроокружении. **Выводы.** Получен аффинно очищенный на Ni-NTA агарозе мутантный одготриптофановый белок мини *VtTyrRS*, пригодный для флуоресцентных исследований структурно-динамических и функциональных свойств фермента.

Ключевые слова: тирозил-тРНК синтетаза, мутантная форма мини *TyrRS*, бактериальная экспрессия

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Homes M.A.R., Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases // RNA. – 2020. – Vol. 26. – P. 910–936.
2. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1998. – 14, № 4. – С. 349–359.
3. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A., Murray C.J. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Biopolym. Cell. – 1999. – Vol. 15, № 2. – P. 168–172.
4. Guo M., Schimme I P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases // Nat. Chem. Biol. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 145–153.
5. Туроверов К.К., Кузнецова И.М. Собственная флуоресценция глобулярного актина. Особенности локализации триптофановых остатков // Биорганическая химия. – 1998. – 24, № 12. – P. 893–898.
6. Кондратюк Ю., Бабарик М., Корнелюк О. Оптимізація процесу біос-



- интезу каталітичного модуля тирозил-тРНК синтетази ссавців та його дослідження імунохімічними методами // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія біологія. – 2009. – № 56. – С. 33–35.
7. Zayets V.N., Tsuvarev A. Yu., Kolomiets L.A., Korneliuk A.I. Site-directed mutagenesis of tryptophan residues in the structure of the catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase from *Bos taurus* // Cytol. Genet. – 2019. – Vol. 53, № 3. – P. 47–57.
 8. Rosano G.L., Cessarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // Front. Microbiol. – 2014. Vol. 5. – P. 1–17.
 9. Joseph B.C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., Murthy M., Selvakumar K., Ganesan M., Manjunath S.R. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* // J. Cell. Sci. Ther. – 2015. – Vol. 6, № 5. 221. doi:org/10.4172/2157-7013.1000221
 10. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids // Gene. – 1990. – № 96. – P. 23–28.
 11. Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2th ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 12. Zayets V.N., Lozhko D.M., Tsuvarev O.Yu., Kolomiets L.A., Zub P.E., Korneliuk A.I. Isolation and characterization of the mutant form of N-terminal catalytic module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase with replacement of Trp 40 and Trp 283 by alanine // Biopolym. Cell. – 2020. – Vol. 36, № 5. – P. 329–340.
 13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259. – P. 680–685.
 14. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISSMODEL: homology modeling of protein structures and complexes // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.
 15. Леванец О.В., Найденов В.Г., Вудмаска М.И., Одынец К.А., Мацука Г.Х., Корнелюк А.И. ПЦР-амплификация, клонирование и секвенирование фрагмента кДНК, кодирующего нуклеотидсвязывающий домен тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1996. – 12, № 5. – С. 66–70.
 16. Yang X.-L., Skene R.G., McRee D.E., Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // PNAS. – 2002. – Vol. 99, № 24. – P. 15369–15374.
 17. Kravchuk O.V., Savytskyi O.V., Odynets K.O., Mykuliak V.V., Korneliuk A.I. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates // J. Biomol. Struct. Dynamics. – 2016. – Vol. 35, № 13. – P. 2772–2788.
 18. Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.И. Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази ссавців при культивуванні штаму *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysE* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – 4, №8. – С. 6–12.
 19. Reshetnyak Y.K., Burnstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluo-



rescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // *Biophysical J.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1710–1734.

20. Чиста С.В., Корнелюк О.І. Флуоресценція і динаміка мікрооточення триптофанових залишків евкаріотної тирозил-ТРНК синтетази // *Фізика живого.* – 2014. – № 21(1-2). – С. 24–28.

REFERENCES

1. Homes MAR., Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA.* 2020; 26: 910–936.
2. Kornelyuk AI. Structural and functional investigation of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1998; 14(4): 349–359 (in Russian).
3. Kornelyuk AI, Tas MP, Dubrovsky A, Murray CJ. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1999; 15(2): 168–72.
4. Guo M, Schimmel P. Essential nontranslational function of tRNA synthetases. *Nat. Chem. Biol.* 2013; 9(3): 145–153.
5. Turoverov KK, Kuznetsova IM. The intrinsic fluorescence of globular actin: peculiarities in the location of tryptophan residues. *Bioorg. Chem.* 1998; 24(12): 893–898 (in Russian).
6. Kondratyuk YuYu, Babaryk MA, Kornelyuk AI. Optimization of the process of biosynthesis of the mammalian tyrosyl-tRNA synthetase catalytic module and its study by immunochemical methods. *Bulletin of Kyiv Taras Shevchenko National University, series Biology.* 2009; 56: 33–35 (in Ukrainian).
7. Zayets VN, Tsuvarev AYU, Kolomiets LA, Kornelyuk AI. Site-directed mutagenesis of tryptophan residues in the structure of the catalytic module of tyrosyl-tRNA synthetase from *Bos taurus*. *Cytol. Genet.* 2019; 53(3): 47–57.
8. Rosano GL, Cessarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014; 5: 1–17.
9. Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S, Murthy M, Selvakumar K, Ganesan M, Manjunath SR. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *J. Cell. Sci. Ther.* 2015; 6(5): 221. doi:org/10.4172/2157-7013.1000221
10. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* plasmids. *Gene.* 1990; 96: 23–28.
11. Sambrook J, Fritsch T, Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. Zayets VN, Lozhko DM, Tsuvarev OYu, Kolomiets LA, Zub PE, Kornelyuk AI. Isolation and characterization of the mutant form of N-terminal catalytic module of *Bos taurus* tyrosyl-tRNA synthetase with replacement of Trp40 and Trp283 by alanine. *Biopolym. Cell.* 2020; 36(5): 329–340.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–685.
14. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-



- MODEL: homology modeling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1): W296–W303.
15. Levanets OV, Naidenov VG, Woodmaska MI, Odynets KA, Matsuka GH, Kornelyuk AI. PCR amplification, cloning and sequencing of cDNA fragment encoding a nucleotide binding domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Biopolym. Cell.* 1996; 12(5): 66–70 (in Russian).
 16. Yang X-L, Skene RG, McRee DE, Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytosine. *PNAS.* 2002; 99(24): 15369–15374.
 17. Kravchuk OV, Savytskyi OV, Odynets KO, Mykuliak VV, Kornelyuk AI. Computational modeling and molecular dynamics simulations of mammalian cytoplasmic tyrosyl-tRNA synthetase and its complexes with substrates. *J. Biomol. Struct. Dynamics.* 2016; 35(13): 2772–2788.
 18. Kondratyuk YuYu, Babaryk MA, Kornelyuk AI. Bacterial expression optimization of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase on strain *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysE cultivation. *Microbiology & Biotechnology.* 2009; 4(8): 6–12 (in Ukrainian).
 19. Reshetnyak YK, Burnstein EA. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. *Biophysical J.* 2001; 81: 1710–1734.
 20. Chysta SV, Kornelyuk AI. Fluorescence and dynamics of microenvironment of tryptophan residues in mammalian tyrosyl-tRNA synthetase. *Physics of the alive.* 2014; 21(1-2): 24–28 (in Ukrainian).

Стаття надійшла до редакції 27.07.2021 р.



УДК 543.31

**Т.В. Гудзенко, О.Г. Горшкова, О.В. Волювач,
Т.В. Бурлака, І.П. Метеліцина**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

МІКРОБІОЛОГІЧНА І САНІТАРНО- ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТІЧНИХ ВОД ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ПІДПРИЄМСТВА

Мета. Оцінка стічних вод фармацевтичного підприємства за санітарно-мікробіологічними та хімічними показниками для визначення методу очистки та ремедіації їх від політантів та патогенів. **Методи.** При санітарно-бактеріологічних дослідженнях для визначення загального мікробного числа (ЗМЧ), патогенних бактерій використовували класичні мікробіологічні методи. Визначення концентрації амонію, нітриту та нітрату в пробах стічних вод фармацевтичного підприємства проводили спектрофотометрично з використанням хімічної реакції йонів на реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоти. Вміст йонів важких металів визначали методом електротермічної атомно-абсорбційної спектрофотометрії (ААС) з використанням приладу «Сатурн-2», фотометричним методом з використанням 4-аміноантипірину – фенол, екстракційно-фотометричним методом – поверхнево-активні речовини, методом інфрачервоної спектрометрії – нафтові вуглеводні. **Результати.** Експериментально підтверджено, що загальне мікробне число у пробах стічної води фармацевтичного підприємства незначно перевищувало нормативний показник. Індекс бактерій групи кишкової палички (БГКП) та індекс *E. coli* були у межах норми. У стічній воді фармацевтичного підприємства були виявлені патогенні бактерії *Salmonella moscow* і *Klebsiella pneumoniae*. Про забрудненість фармстоку можна судити і за перевищеною у 8,5 разів порівняно з гранично допустимою концентрацією (ГДК) в них йонів амонію. Результати хімічного аналізу проб стічних вод фармацевтичного підприємства свідчать про багатокомпонентність їх складу. Із йонів важких металів було зафіксовано переважно йони цинку, міді, свинцю, хрому шестивалентного і кадмію. За виключенням йонів кадмію, концентрація йонів важких металів в 1,4–7,2 рази перевищувала норму ГДК. У фармстоках переважали аніонні поверхнево-активні речовини – їх концентрація складала $8,2 \pm 0,7$ мг/дм³. Рівень фенольного і нафтового забруднення стічних вод був порівняно із вмістом в них аніонних поверхнево-активних речовин мінімальним, що могло бути викликано діяльністю аборигенних штамів бактерій-деструкторів, що володіють високою фенолокиснювальною здатністю. **Висновок.** Результати санітарно-мікробіологічного і хімічного аналізу стічних вод фармацевтичного підприємства свідчать про їх багатокомпонентність і екологічну небезпечність – в них присутні патогенні бактерії *Salmonella moscow* і *Klebsiella pneumoniae* і політанти різної природи: йони важких металів *Cu(II)*, *Cr(VI)* і *Pb(II)* в концентрації $36,0 \pm 1,4$ мкг/дм³, $3,0 \pm 0,4$ мкг/дм³ і $14,0 \pm 0,7$ мкг/дм³ відповідно,



та органічні забруднювачі – фенол, нафтопродукти і аніонні ПАР в концентрації $0,003 \pm 0,0006$ мг/дм³, $0,81 \pm 0,05$ мг/дм³ і $8,2 \pm 0,7$ мг/дм³ відповідно. Рекомендуємо проводити комплексну очистку стічних вод фармацевтичного підприємства від фенолу, йонів важких металів [Cu (II), Cr (VI), Zn (II)], нафтопродуктів, аніонних поверхнево-активних речовин і патогенів.

Ключові слова: стічні води, фармацевтичне підприємство, мікробіологічні та санітарно-хімічні характеристики

Проблема забруднення природних об'єктів умовно-патогенними та патогенними бактеріями, техногенними відходами неорганічного та органічного походження стає все більш гострою, оскільки впливає на здоров'я людей. Виробничі стічні води надзвичайно різноманітні за кількістю і складом, які, у свою чергу, залежать від виду виробництва, сировини і технології, що застосовується [6]. Особливу екологічну небезпеку становлять стічні води фармацевтичних підприємств, що характеризуються високою концентрацією токсичних та генотоксичних органічних речовин [13]. Мікробіологічне забруднення фармацевтичних стічних вод сприяє поширенню у довкіллі генів стійкості до антибіотиків [14]. Сучасний розвиток фармацевтичного виробництва зумовлює потужний викид у довкілля важкоокиснювальних, фенольних й інших небезпечних сполук [11]. Тому аналіз стічних вод різних виробництв, у тому числі фармацевтичного підприємства, є необхідним для визначення подальшого методу їх очистки для визначення можливості випуску у водойми, каналізацію або повторне використання [2, 6, 9-11, 16]. У багатьох країнах біологічна очистка є основним найефективнішим способом очистки стічних вод фармацевтичного виробництва від органічних забруднювачів [11].

Мета роботи – оцінка стічних вод фармацевтичного підприємства за санітарно-мікробіологічними та хімічними показниками для визначення методу очистки та ремедіації їх від поллютантів та патогенів.

Матеріали і методи

Санітарно-мікробіологічні дослідження стічних вод українського фармацевтичного підприємства (ФП) проводили згідно з нормативними документами [5]. Проби стічних вод фармацевтичного виробництва відбирали з каналізаційних колодязів у стерильні флакони місткістю 500 см³ (для санітарно-бактеріологічних досліджень) та щільно закривали корками. Відбір проб проводили з дотриманням правил асептики.

При санітарно-бактеріологічних дослідженнях стічних вод ФП для визначення загального мікробного числа (ЗМЧ) використовували класичні мікробіологічні методи. Визначення ЗМЧ проводили методом глибинного посіву серійних розведень стічної води у живильний агар і враховували усі колонії мікроорганізмів, що виростили при температурі 37 °С протягом 24 годин чи при 22 °С протягом 48 годин в глибині та на поверхні живильного агару. Повторність дослідів була п'ятикратна. Підраховували кількість колоній мікроорганізмів у кожному з паралельних посівів одного розведення. За результатами визначали середньоарифметичне значення числа колоній в посівах одного



розведення. При підрахунку враховували кратність розведення проби. Результат виражали у колонієутворювальних одиницях (КУО) в 1 см³ досліджуваної проби стічної води.

Титраційним методом визначали індекс бактерій групи кишкової палички (БГКП) – грамнегативних оксидазонегативних паличок, що не утворюють спор та зброджують глюкозу з утворенням кислоти та газу при 37 °С протягом 24 годин. Як основний показник ступеня фекального забруднення стічної води визначали лактозопозитивні кишкові палички (ЛКП), до яких відносяться грамнегативні, неспорують палички, що ферментують лактозу до кислоти і газу за температури 37 °С протягом 24 годин, з негативним оксидазним тестом. Число лактозопозитивних кишкових паличок визначали титраційним методом. Дози стічної води засіявали паралельно у 3 порції лактозо-пептоного середовища, 50 мл досліджуваної води вносили у флакони з 15 мл концентрованого лактозо-пептоного середовища, 1 мл проби і 1 мл розведень вносили у пробірки з 10 мл середовища нормальної концентрації. Посіви інкубували за температури 37 °С протягом 24 годин. З посівів у середовище накопичення, де виявлялось помутніння і газоутворення, проводили висів на поверхню підтверджуючого щільного фуксин-сульфітного середовища Ендо. Посіви на середовище Ендо інкубували за температури 37 °С протягом 16–18 годин. Поява характерних для лактозопозитивних кишкових паличок колоній (темно-червоних з металевим блиском і без нього) дозволяла надати позитивну відповідь. Після визначення результатів на наявність лактозопозитивних кишкових паличок в об'ємах води, засіяних у середовище накопичення, обчислювали колі-індекс за таблицями.

Виявлення числа бактерій *Esherichia coli*. До групи кишкових паличок відносять лактозопозитивні кишкові палички, які ферментують лактозу при температурі 44,5 °С і утворюють індол при цій же температурі. При виявленні числа термотолерантних кишкових паличок *E. coli* пересівали темно-червоні лактозопозитивні колонії в лактозний бульйон з борною кислотою або з брильянтовым зеленим, який спочатку нагрівали у термостаті. Відразу ж після посіва пробірки ставили в термостат і інкубували 24 години при температурі 43–44 °С. Помутніння і газоутворення в пробірці свідчить про свіже фекальне забруднення стічної води. Після встановлення позитивних і негативних результатів у засіяних в середовищах накопичення об'ємах води на наявність *E. coli* виявляли їх число у 1 л води. Наявність у воді *E. coli* більше 1000 в 1 л свідчило про господарсько-фекальне забруднення та недотримання вимог до очищення стічних вод.

Визначення патогенних ентеробактерій, в тому числі сальмонел здійснювали на щільних диференційно-діагностичних живильних середовищах Ендо та вісмут-сульфітному агарі з подальшим висівом на комбіноване середовище Олькеницького. Ентерококи виявляли на лужно-поліміксиновому та щільному молочно-інгібіторному середовищах для підтвердження фекального характеру забруднення стічних вод. Визначення числа стафілококів здійснювали на молочно-жовточно-сольовому агарі – підраховували блискучі, опуклі колонії білого, бежевого чи золотавого кольорів, оточені райдужною хариною з перламутровим блиском.



Для визначення загальної чисельності факультативно-анаеробних ендоспороутворювальних бактерій у пробі стічної води фармвиробництва готували розведення 2×10^{-4} шляхом внесення 100 мкл досліджуваного матеріалу до пробірки з 4,900 мкл фізіологічного розчину. Для виявлення ендоспор аліквоту проби піддавали пастеризації у режимі 80 °С протягом 10, 15 та 20 хв. Після пастеризації без розведення проводили висів кожної проби на стерильний м'ясо-пептонний агар (МПА) в 4-х повторях. Посівна доза – 100 мкл на чашку Петрі. Інкубацію інокульованих чашок Петрі проводили за температури +30 °С протягом 2-х діб. Після наведеного часу проводили ручний підрахунок чисельності колоній на чашках.

Оцінку фізико-хімічних властивостей стічних вод фармацевтичного підприємства здійснювали за питомою електропровідністю, значенням рН, величиною поверхневого натягу. Значення рН досліджуваних проб стічної води фармацевтичного підприємства реєстрували йономером універсальним (рН-метром типу ЄВ-74) за допомогою скляного електроду, допоміжного електроду, термокомпенсатору, не пізніше, ніж через 2 години після відбору проби. Величину поверхневого натягу (σ_x) фармстоків відносно контролю – ($\sigma(\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}})^{18} = 73,05 \text{ мН/м}$) визначали за методом Вільгельмі.

Визначення концентрації амонію, нітриту та нітрату в отриманому зразку проводили спектрофотометрично з використанням хімічної реакції йонів на реактив Несслера, реактив Грісса та фенолсульфідокислоти [8].

Вміст йонів важких металів (ЙВМ) у пробах стічної води фармацевтичного підприємства визначали методом електротермічної ААС з використанням приладу «Сатурн-2» у полум'ї суміші «повітря – пропан – бутан» при відповідних довжинах хвиль [4].

Для визначення фенольних сполук у стічній воді ВФП використовували фотометричний метод з використанням 4-аміноантипірину, що заснований на утворенні забарвлених сполук фенолу з 4-аміноантипірином в присутності гексаціаноферату (III) $\text{pH} = 10,0 \pm 0,2$ [4]. Вміст поверхнево-активних речовин (ПАР) визначали екстракційно-фотометричним методом; вуглеводнів нафти – методом інфрачервоної спектрометрії; фенольних сполук – колориметричним методом з використанням 4-аміноантипірину [1, 3].

Проводили окремі серії досліджень (три серії випробувань, $n = 3$). Достовірність відмінностей між середніми значеннями концентрації визначуваної речовини у пробах фармстоку визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$). Обробку даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003».

Результати та їх обговорення

Результати санітарно-мікробіологічного дослідження стічних вод фармацевтичного підприємства представлені у табл. 1, рис. 1. Загальне мікробне число (ЗМЧ) – це число мезофільних аеробних і факультативно анаеробних мікроорганізмів, здатних утворювати на живильному агарі при температурі 37 °С і впродовж 24 годин колонії. Визначення ЗМЧ дозволяє оцінити рівень мікробного забруднення стічної води.



Таблиця 1
Санітарно-мікробіологічні показники стічних вод фармацевтичного підприємства
Table 1
Sanitary and microbiological indicators of pharmaceutical wastewater

Вид стічних вод	ЗМЧ КУО/см ³	Індекс, КУО/см ³		Патогенні бактерії
		БГКП	<i>E. coli</i>	
Фармацевтичні	7×10^3	$< 1 \times 10^3$	$0,6 \times 10^3$	<i>K. pneumoniae</i> <i>S. moscow</i>

Із представлених експериментальних даних видно, що загальне мікробне число у стічних водах фармацевтичного підприємства незначно перевищувало нормативний показник (1×10^3 КУО/см³) і складало 7×10^3 КУО/см³. Індекс БГКП та індекс *E. coli* були у межах норми: $< 1 \times 10^3$ КУО/см³ і $0,6 \times 10^3$ КУО/см³ відповідно. У стічних водах фармацевтичного підприємства були виявлені патогенні бактерії *Salmonella moscow* і *Klebsiella pneumoniae*.

Представляло інтерес визначити динаміку чисельності мезофільних ендоспороутворювальних мікроорганізмів у стічних водах фармацевтичного виробництва. Результати мікробіологічних досліджень представлені на рис. 1.

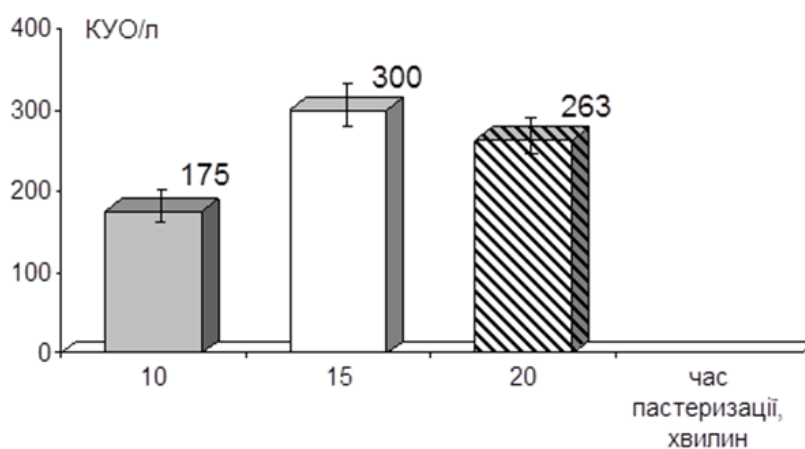


Рис. 1. Чисельність КУО факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій у стічних водах фармацевтичного підприємства за різних термінів пастеризації

Fig. 1. The number of CFU of colony-forming units of facultative anaerobic spore-forming bacteria in the wastewater of a pharmaceutical company in different periods of pasteurization

З представлених даних видно, що у стічних водах фармацевтичного підприємства за різних термінів пастеризації кількість колонієутворювальних одиниць факультативно-анаеробних ендоспороутворювальних бактерій варіювала від 175 КУО/л до 300 КУО/л. Найбільш висока чисельність спороутворювальних бактерій на МПА реєструвалася після 15 хв пастеризації проби



стічної води фармацевтичного підприємства. Збільшення терміну пастеризації до 20 хв призводило до зниження цього показника.

З колоній факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій, що вирости на МПА, за морфологічними властивостями було відібрано і очищено 14 штамів з метою подальшого їх використання як деструкторів у біотехнології очистки стічних вод від органічних забруднювачів, в тому числі фенольних сполук, які, зазвичай, присутні в стічних водах фармацевтичного підприємства.

Результати оцінки фізико-хімічних показників проб стічної води ФП представлені в таблиці 2, з якої видно: значення питомої електропровідності дорівнює $\sim 3,05 \times 10^{-2} 1/(\text{Ом} \cdot \text{см})$, значення рН стоку нейтральне, $7,35 \pm 0,1$ од. рН.

Таблиця 2

Основні фізико-хімічні показники проб стічної води фармацевтичного підприємства

Table 2

The basic physical and chemical indicators of wastewater samples of a pharmaceutical company

Показники стічної води, одиниці виміру	Стічна вода ВФП
рН (од. рН)	$7,35 \pm 0,1$
Питома електропровідність, $1/(\text{Ом} \cdot \text{см})$	$\sim 3,05 \cdot 10^{-2}$
Поверхневий натяг (σ_x) стічної води ФП, мН/м	$44,44 \pm 0,5$
$\sigma (\text{H}_2\text{O})^{18} = 73,05 \text{ мН/м};$ $K (\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}) = 0,266$ (K – виміряна стала для $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ за температури $^{\circ}\text{C}$)	

Проведені перед хімічним аналізом проб стічної води ФП тензіометричні дослідження – визначення поверхневого натягу (σ_x) стічної води (дослідні проби) відносно контролю – дистильованої води (за методом Вільгельмі – пластинки, що втягується в розчин) за температури 18°C дозволили припустити, що дослідна проба містить органічні речовини, які здатні знижувати поверхневий натяг (σ) води [$\sigma (\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}})^{18} = 73,05 \text{ мН/м}$].

З урахуванням похибки методу Вільгельмі ($\pm 0,5 \text{ мН/м}$) значення поверхневого натягу стічної води виробництва фармацевтичних препаратів зменшувалося з $73,05$ до $44,44 \pm 0,5 \text{ мН/м}$ (на $28,61\%$). Це непрямим способом вказувало на наявність в такій воді органічних речовин, здатних адсорбуватися на межі поділу фаз розчин-повітря.

У результаті дослідження санітарно-хімічних показників якості стічних вод фармацевтичного підприємства встановлено, що концентрація нітрат- та нітрит-іонів була значно меншою за ГДК, встановлених для рибогосподарських водойм (табл. 3). Однак, щодо іонів амонію спостерігалось перевищення ГДК в $8,5$ разів. Із літературних джерел відомо, що за наявності у стічних водах іонів амонію відбувається максимальна їх очистка від фенольних сполук, зокрема автори роботи [12], спостерігали ефективно одночасне видалення фенолу і іонів амонію нітрифікувально-денітрифікувальними бактеріями *Serratia* sp. LJ-1.



Таблиця 3

Санітарно-хімічні показники якості стічних вод
фармацевтичного підприємства

Table 3

Sanitary and chemical indicators of the quality of wastewater
from a pharmaceutical company

Досліджувані йони	Вміст йонів, мг/дм ³	Норма ГДК мг/дм ³	Порівняно із ГДК
Нітрат-йони (NO ₃ ⁻)	6,02±0,7	40,0*	<ГДК*
Нітрит-йони (NO ₂ ⁻)	0,03±0,003	0,08*	<ГДК*
Йони амонію (NH ₄ ⁺)	24,61±2,5	2,9*	>ГДК*
Хлор-йони (Cl ⁻)	909,7±15,2	300,0* 350,0** 11900***	>ГДК* >ГДК** <ГДК***
Сульфат-йони (SO ₄ ²⁻)	162±11,7	100,0* 400,0** 3500***	>ГДК* <ГДК** <ГДК***

Примітка: $M \pm m$ при $p \leq 0.05$, $n=3$; * – гранично-допустима концентрація у воді водойм, що використовуються для рибогосподарських цілей ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm]); ** – допустиме значення згідно з правилами приймання стічних вод до систем централізованого водовідведення ([7] Наказ Міністерства регіонального розвитку, будівництва та житлово-комунального господарства України 01.12.2017 № 316. Додаток 4 до Правил приймання стічних вод до систем централізованого водовідведення (пункт 2 розділу IV). ВИМОГИ до складу та властивостей стічних вод, що скидаються до системи централізованого водовідведення, для безпечного їх відведення та очищення у каналізаційних очисних спорудах (КОС); *** – гранично-допустима концентрація у морських водах;

Note: $M \pm m$ at $p \leq 0.05$, $n=3$; * - maximum permissible concentration in water of reservoirs used for fishery purposes ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm]); ** - permissible value in accordance with the rules for receiving wastewater into central sewerage systems ([7] Order of the Ministry of Regional Development, Construction and Housing and Communal Services of Ukraine dated 01.12.2017 No. 316. Annex 4 to the Rules for receiving wastewater into central sewerage systems (paragraph 2 of section IV). REQUIREMENTS for the composition and properties of wastewater discharged into the sewerage system for their safe disposal and cleaning in sewage treatment plants (STP); *** - maximum permissible concentration in sea waters.

Хімічний аналіз показав, що в пробах стічної води фармацевтичного підприємства присутні високоотоксичні йони важких металів, переважно йони цинку, міді, свинцю, хрому шестивалентного і кадмію (табл. 4). За виключенням йонів кадмію, концентрація йонів важких металів в 1,4–7,2 рази перевищувала норму ГДК. Йони хрому шестивалентного та йони міді фіксувалися із перевищенням їхньої концентрації ГДК у воді водойм, що використовуються для рибогосподарських цілей [15] відповідно у 3,0 і 7,2 рази. Наслідком впливу йонів важких металів на здоров'я людини є: органічні зміни в тканинах, ракові захворювання шкіри, порушення нервової системи, тощо.

Із органічних компонентів забруднення у пробах стічної води фармацевтичного підприємства були виявлені поверхнево-активні речовини, фенол



Таблиця 4

**Вміст неорганічних компонентів забруднення у пробах стічної води
фармацевтичного підприємства**

Table 4

**The content of inorganic pollutants in wastewater samples
a pharmaceutical company**

Йони важких металів	Концентрація йонів важких металів (мкг/дм ³)	ГДК мкг/дм ³	Порівняно із ГДК
Цинк Zn (II)	52,0±1,6	10,0* 50,0** 100,0***	>ГДК**
Мідь Cu (II)	36,0±1,4	5,0** 500,0***	> ГДК**
Хром Cr (VI)	3,0±0,4	1,0* 100,0***	> ГДК*
Свинець Pb (II)	14,0±0,7	100,0* 10,0** 100,0***	>ГДК**
Кадмій Cd (II)	≤5,0±0,5	10,0* 10,0***	≤ГДК*

Примітка: $M \pm m$ при $p \leq 0.05$, $n=3$; * – гранично-допустима концентрація у воді водойм, що використовуються для рибогосподарських цілей ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm_11.htm]); ** – гранично-допустима концентрація у морських водах; *** – допустиме значення згідно з правилами приймання стічних вод до систем централізованого водовідведення ([7] Наказ Міністерства регіонального розвитку, будівництва та житлово-комунального господарства України 01.12.2017 № 316).

Note: $M \pm m$ at $p \leq 0.05$, $n=3$; * – maximum permissible concentration in water of reservoirs used for fishery purposes ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm_11.htm]); ** – maximum permissible concentration in sea waters; *** – permissible value in accordance with the rules for receiving wastewater into centralized sewerage systems ([7] Order of the Ministry of Regional Development, Construction and Housing and Communal Services of Ukraine dated 01.12.2017 No. 316).

і нафтопродукти (табл. 5). Відомо [2, 6] що нафтові вуглеводні та фенольні сполуки (одноатомні та багатоатомні феноли, нафтоли і їх похідні (саліцилова кислота, п-амінофенол, м-аміофенол і ін.) широко представлені в технології синтезу фармацевтичних препаратів [2], і як наслідок завжди присутні у фармстоках) є високотоксичними органічними забруднювачами навколишнього середовища. Вони негативно впливають на здоров'я людини: подразнюють шкіру, викликаючи дерматит, спричиняють розлади функції нервової системи.

Рівень нафтового та фенольного забруднення стічних вод фармацевтичного підприємства порівняно із забрудненням їх аніонними ПАР був мінімальним, що могло бути спричинено діяльністю аборигенних штамів бактерій-деструкторів, що володіють високою нафтоокиснювальною та фенолоокиснювальною здатністю. У фармстоках переважали аніонні ПАР. Їх



концентрація перевищувала норму ГДК у воді водойм, що використовуються для рибогосподарських цілей [15], в 16,4 рази. Поверхнево-активні речовини, потрапляючи до організму людей і тварин, акумулюються та провокують онкологічні захворювання, захворювання кровотворної, імунної та кровоносної систем [1, 6].

Таблиця 5

Вміст органічних компонентів забруднення у пробах стічної води фармацевтичного підприємства

Table 5

The content of organic pollutants in wastewater samples a pharmaceutical company

Органічні компоненти забруднення	Концентрація органічних компонентів забруднення (мг/дм ³)	ГДК, мг/дм ³	Перевищення ГДК
Нафтопродукти	0,81±0,05	0,05*	>ГДК*
Фенол	0,003±0,0006	0,001*	> ГДК*
Аніонні ПАР	8,2±0,7	0,5*	>ГДК*

Примітка: $M \pm m$ при $p \leq 0.05$, $n=3$; * – гранично-допустима концентрація у воді водойм, що використовуються для рибогосподарських цілей ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm])

Note: $M \pm m$ at $p \leq 0.05$, $n=3$; * – maximum permissible concentration in water of reservoirs used for fishery purposes ([15] http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm]).

Результати санітарно-мікробіологічного і хімічного аналізу стічних вод фармацевтичного підприємства свідчать про їх багатокомпонентність і екологічну небезпечність – в них присутні патогенні бактерії *Salmonella moscow* і *Klebsiella pneumoniae* і полютанти різної природи: йони важких металів Cu(II), Cr (VI) і Pb (II) в концентрації 36,0±1,4 мкг/дм³, 3,0±0,4 мкг/дм³ і 14,0±0,7 мкг/дм³ відповідно, та органічні компоненти забруднення – фенол, нафтопродукти і аніонні ПАР в концентрації 0,003±0,0006 мг/дм³, 0,81±0,05 мг/ дм³ і 8,2±0,7 мг/дм³ відповідно.

Рекомендуємо проводити комплексну очистку стічних вод фармацевтичного підприємства від фенолу, йонів важких металів [Cu (II), Cr (VI), Zn (II)], нафтопродуктів, аніонних поверхнево-активних речовин і патогенів.



**T.V. Gudzenko, O.G. Gorshkova, O.V. Voliuvach,
T.V. Burlaka, I.P. Metelitsina**

Odesa National I.I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;
tel.: 068 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

MICROBIOLOGICAL AND SANITARY - CHEMICAL CHARACTERISTICS OF WASTEWATER FROM PHARMACEUTICAL COMPANY

Summary

Aim. Assessment of wastewater from a pharmaceutical company according to sanitary-microbiological and chemical indicators to determine the method of treatment and remediation of them from pollutants and pathogens. **Methods.** In sanitary and bacteriological studies, classical microbiological methods were used to determine the total microbial number of pathogenic bacteria. Determination of the concentration of ammonium, nitrite and nitrate in wastewater samples from a pharmaceutical company was carried out spectrophotometrically using the chemical reaction of ions to Nessler's reagent, Griss reagent, and phenol sulfide acid. The content of heavy metal ions was determined by the method of electrothermal AAS using the device "Saturn-2", by the photometric method using 4-aminoantipyrine – phenol, by the extraction-photometric method – by surfactants, by the method of infrared spectrometry – by petroleum hydrocarbons. **Results.** It was experimentally confirmed that the total microbial count in wastewater samples from a pharmaceutical company slightly exceeded the standard value. The BGKP index and the *E. coli* index were within the normal range. The pathogenic bacteria *Salmonella moscow* and *Klebsiella pneumoniae* were found in the wastewater of pharmaceutical company. The contamination of pharmaceutical stock can be judged by the 8.5 times excess of the concentration of ammonium ions in them compared to the MPC. The results of chemical analysis of wastewater samples from a pharmaceutical company indicate their multicomponent composition. Of the heavy metal ions, ions of zinc, copper, lead, hexavalent chromium and cadmium were mainly detected. With the exception of cadmium ions, the concentration of heavy metal ions was 1.4–7.2 times higher than the MPC norm. Anionic surfactants predominated in pharmaceutical stocks – their concentration was $8.2 \pm 0.7 \text{ mg/dm}^3$. The level of phenolic and oil pollution of wastewater was minimal in comparison with the content of anionic surfactants, which could be caused by the activity of aboriginal strains of bacteria-destroyers with a high phenolic capacity. **Conclusion.** The results of sanitary-microbiological and chemical analysis of wastewaters of a pharmaceutical company indicate their multicomponent nature and environmental hazard – they contain pathogenic bacteria *Salmonella moscow* and *Klebsiella pneumoniae* and pollutants of various nature: heavy metal ions Cu (II), Cr (VI) and Pb (II) at a concentration of $36.0 \pm 14 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$, $3.0 \pm 0.4 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$ and $14.0 \pm 0.7 \text{ } \mu\text{g/dm}^3$, respectively, and organic pollutants – phenol, oil products and anionic surfactants at a concentration of $0.003 \pm 0.0006 \text{ mg/dm}^3$, $0.81 \pm 0.05 \text{ mg/dm}^3$ and $8.2 \pm 0.7 \text{ mg/dm}^3$, respectively. We recommend to carry out a comprehensive purification of wastewater from a pharmaceutical company from phenol, heavy metal ions [Cu (II), Cr (VI), Zn (II)], oil products, anionic surfactants and pathogens.

Key words: wastewater; pharmaceutical company; microbiological and sanitary - chemical characteristics



**Т.В. Гудзенко, Е.Г. Горшкова, О.В. Волювач,
Т.В. Бурлака, І.П. Метелиціна**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И САНИТАРНО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТОЧНЫХ ВОД ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРЕДПРИЯТИЯ

Реферат

Цель. Оценка сточных вод фармацевтического предприятия по санитарно-микробиологическим и химическим показателям для определения метода очистки и ремедиации их от загрязнителей и патогенов. **Методы.** При санитарно-бактериологических исследованиях для определения общего микробного числа, патогенных бактерий использовали классические микробиологические методы. Определение концентрации аммония, нитрита и нитрата в пробах сточных вод фармацевтического предприятия проводили спектрофотометрически с использованием химической реакции ионов на реактив Несслера, реактив Грисса и фенолсульфидокислоты. Определяли методом электротермической ААС с использованием прибора «Сатурн-2» содержание ионов тяжелых металлов, фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина – фенол, экстракционно-фотометрическим методом – поверхностно-активные вещества, методом инфракрасной спектрометрии – нефтяные углеводороды. **Результаты.** Экспериментально подтверждено, что общее микробное число в пробах сточной воды фармацевтического предприятия незначительно превышало нормативный показатель. Индекс БГКП и индекс *E. coli* были в пределах нормы. В сточной воде фармацевтического предприятия были обнаружены патогенные бактерии *Salmonella moscow* и *Klebsiella pneumoniae*. О загрязненности фармстока можно судить и по превышению в 8,5 раза по сравнению с ПДК концентрацией в них ионов аммония. Результаты химического анализа проб сточных вод фармацевтического предприятия свидетельствуют о многокомпонентности их состава. Из ионов тяжелых металлов были зафиксированы преимущественно ионы цинка, меди, свинца, хрома шестивалентного и кадмия. За исключением ионов кадмия, концентрация ионов тяжелых металлов в 1,4–7,2 раза превышала норму ПДК. В фармстоках преобладали анионные поверхностно-активные вещества - их концентрация составляла $8,2 \pm 0,7$ мг/дм³. Уровень фенольного и нефтяного загрязнения сточных вод был по сравнению с содержанием в них анионных поверхностно-активных веществ минимальным, что могло быть вызвано деятельностью аборигенных штаммов бактерий-деструкторов, обладающих высокой фенолоксилирующей способностью. **Вывод.** Результаты санитарно-микробиологического и химического анализа сточных вод фармацевтического предприятия свидетельствуют об их многокомпонентности и экологической опасности – в них присутствуют патогенные бактерии *Salmonella moscow* и *Klebsiella pneumoniae* и загрязнители различной природы: ионы тяжелых металлов *Cu(II)*, *Cr(VI)* и *Pb(II)* в концентрации $36,0 \pm 1,4$ мкг/дм³, $3,0 \pm 0,4$ мкг/дм³ и $14,0 \pm 0,7$ мкг/дм³ соответственно, и органические загрязнители – фенол, нефтепродукты и анионные ПАВ в концентрации $0,003 \pm 0,0006$ мг/дм³,



$0,81 \pm 0,05$ мг/дм³ і $8,2 \pm 0,7$ мг/дм³ відповідно. Рекомендуємо проводити комплексну очистку сточних вод фармацевтичного підприємства від фенола, іонів важких металів [Cu (II), Cr (VI), Zn (II)], нафтопродуктів, аніонних поверхностно-активних речовин і патогенів.

Ключевые слова: сточные воды, фармацевтическое предприятие, микробиологические и санитарно - химические характеристики

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Абрамзон А. А., Зайченко Л. П., Файнгольд С. И.* Поверхностно-активные вещества. Л.: Химия, 1988. – 200 с.
2. *Быкова Г.С., Шаталаев И.Ф., Воронин А.В.* Фитомасса наяды мелкозубчатой в доочистке фенол-содержащих загрязненных вод фармацевтических производств // Медицинский альманах. – 2014. – № 1(31). – С. 102–105.
3. *Леоненко И.И., Антонович В.П., Андрианов А.М., Безлуцкая И.В., Цымбалюк К.К.* Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) // Методы и объекты химического анализа. – 2010. – Т. 5, № 2. – С. 58–72.
4. *Лурье Ю.Ю.* Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. – 448 с.
5. *Методичні вказівки.* МВ 10.2.1-113-2005. Санітарно-мікробіологічний контроль якості питної води, затверджені наказом МОЗ від 03.02.2005 N 60
6. *Мікробіологічні методи очищення стічних вод від органічних забруднювачів :* монографія / В.О. Іваниця, Т.В. Гудзенко, Б.М. Галкін, О.В. Волювач, О.Г. Горшкова – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2020 – 135 с.
7. *Наказ Міністерства* регіонального розвитку, будівництва та житлово-комунального господарства України 01.12.2017 № 316. ВИМОГИ до складу та властивостей стічних вод, що скидаються до системи централізованого водовідведення, для безпечного їх відведення та очищення у каналізаційних очисних спорудах (КОС).
8. *Новиков Ю.В., Ласточкина К.О.* Методы исследования качества воды водоёмов. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1990. – 236 с.
9. *Чабан М.М., Гудзенко Т.В.* Виявлення анамокс бактерій у стічних водах фармацевтичного виробництва // Мікробіологія і біотехнологія. 2019. – №1(46) – С. 48–55.
10. *Gudzenko T.V., Voliuvach O.V., Gorshkova O.G., Ostapchuk A.M., Ivanytsia V.O.* Phenol-oxidizing activity and fatty acid profile of *Brevibacillus centrosporus* F14 strain // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92, № 1. – P. 84–91.
11. *Guo Y., Qi P.S., Liu Y.Z.* A Review on Advanced Treatment of Pharmaceutical wastewater // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2017. – 63. – 012025.
12. *Jian Lu, Qiang Jin, Yiliang He, Xia He, Juan Zhao.* Simultaneous Removal of Phenol and Ammonium Using *Serratia* sp. LJ-1 Capable of Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification // Water, Air, & Soil Pollution. – 2014.



13. Lateef A. The microbiology of a pharmaceutical effluent and its public health implications // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2004. – Vol. 20. – P. 167–171.
14. Tahrani L., Soufi L., Mehri I., Najjari A., Hassan A., Van Loco J., Reyns T., Cherif A., Ben Mansour H. Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters // Microb. Pathog. – 2015. – Vol. 89. – P. 54–61.
15. http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm
16. Патент України на винахід № 116299. Спосіб здійснення дефенолізації промислових стоків / Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляєва Т.О. Номер заявки № а201608635 від 25.07.2016 р. Опубл. 26.02.2018, Бюл. № 4.

REFERENCES

1. Abramzon AA, Zajchenko LP, Fajngol'd SI. Surfactants. L.: Himija, 1988: 200 [in Russian].
2. Bykova GS, Shatalaev IF, Voronin AV. Phytomass of naiad fine-toothed in the post-treatment of phenol-contaminated waters of pharmaceutical company. Medicinskij al'manah. 2014;1(31):102–105 [in Russian].
3. Leonenko II, Antonovich VP, Andrianov AM, Bezluckaja IV, Cymbaljuk KK. Methods for the determination of oil products in waters and other environmental objects (review). Metody i obekty himicheskogo analiza. 2010; 5(2): 58–72 [in Russian].
4. Lur'e JuJu. Analytical chemistry of industrial wastewater. M.: Himija, 1984: 448 [in Russian].
5. Methodical instructions. MB 10.2.1-113-2005. Sanitary and microbiological quality control of drinking water, approved by the order of the Ministry of Health of 03.02.2005 No. 60 [in Ukrainian].
6. Microbiological methods of wastewater treatment from organic pollutants: monograph / VO. Ivanytsia, TV. Gudzenko, BM. Galkin, OV. Voliuvach, OG. Gorshkova – Odesa: Odes'kyj nacional'nyj universytet imeni I. I. Mechnykova, 2020: 135 [in Ukrainian].
7. Order of the Ministry of Regional Development, Construction, Housing and Communal Services of Ukraine, 01.12.2017 No. 316. Requirements for the composition and properties of wastewater discharged into the sewerage system for their safe disposal and treatment in sewage treatment plants [in Ukrainian].
8. Novikov JuV, Lastochkina KO. Methods for studying the quality of water in reservoirs. - 2nd ed. – M.: Medicina, 1990: 236 [in Russian].
9. Chaban MM, Gudzenko TV. Detection of anamox bacteria in pharmaceutical company. Mikrobiologija i biotehnologija. 2019; 1(46): 48–55 [in Ukrainian].
10. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Ostapchuk AM, Ivanytsia V.O. Phenol-oxidizing activity and fatty-acid profile of strain *Brevibacillus centrosporus* F14. Ukr. Biochem. J. 2020; 1(92):84–91 [in Ukrainian].



11. Guo Y, Qi PS, Liu YZ. A Review on Advanced Treatment of Pharmaceutical wastewater. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2017;63: 012025.
12. Jian Lu, Qiang Jin, Yiliang He, Xia He, Juan Zhao. Simultaneous Removal of Phenol and Ammonium Using *Serratia* sp. LJ-1 Capable of Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification. Water, Air, & Soil Pollution, 2014
13. Lateef A. The microbiology of a pharmaceutical effluent and its public health implications. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2004; 20:167–171.
14. Tahrani L, Soufi L, Mehri I, Najjari A, Hassan A, Van Loco J, Reyns T, Cherif A, Ben Mansour H. Isolation and characterization of antibiotic-resistant bacteria from pharmaceutical industrial wastewaters. Microb. Pathog. 2015; 89: 54-61.
15. http://www.cawater-info.net/water_quality_in_ca/norm11.htm
16. Patent of Ukraine for invention No. 116299. Method for carrying out the defenolization of industrial effluents / Ivanytsia V.O., Gorshkova O.G., Gudzenko T.V., Voliuvach O.V., Konup I.P., Belyaeva T.O. Nomer zajavky № a201608635 vid 25.07.2016 r. Opubl. 26.02.2018, Bjul. № 4.

Стаття надійшла до редакції 09.09.2021 р.



УДК 579.69(631.46)

М.Д. Цулукидзе

Сухумский государственный университет,
ул. Анны Политковской, 26, Тбилиси, 0186, Грузия, тел.: +995(32) 2541653,
e-mail: tsulukidzemziya@gmail.com

РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ОТДЕЛЬНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП В СОЛОНЧАКОВЫХ ПОЧВАХ, ПРИЛЕГАЮЩИХ К ОЗЕРУ КУМИСИ (ГРУЗИЯ)

Цель. Выявление особенностей распространения микроорганизмов отдельных физиологических групп в солончаковых почвах, прилегающих к озеру Кумиси. **Методы.** Количественное определение аммонификаторов проводили на мясо-пептонном агаре (МПА), аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов – на среде Имиенецкого-Солнцевой, микробного числа – на мясо-пептонном агаре (МПА), амилотических бактерий и актиномицетов – на среде Чапека, нитрифицирующих бактерий I и II фазы – на соответствующих средах Виноградского, грибов – на модифицированной среде Чапека-Докса. Определение влажности в образцах почв проводили весовым методом, pH – потенциометрически с помощью pH-метра, соленость – методом определения плотного остатка водной вытяжки. Количество микроорганизмов определяли на жидких питательных средах с использованием таблиц Мак-Креди, а на твердых питательных средах визуальным, с учетом образованных колоний, проводя подсчет колоний на чашках Петри, осуществляя пересчет на 1 г абсолютно сухой почвы. **Результаты.** Установлено качественное и количественное соотношение микроорганизмов внутри каждой физиологической группы и между ними. В наибольшем количестве представлены аммонификаторы и амилотические бактерии. В меньшем количестве встречаются остальные сапрофиты, в малом количестве представлены целлюлозоразрушающие микроорганизмы, грибы, актиномицеты, нитрифицирующие бактерии I и II фазы. Корреляционный анализ показал, что существует отрицательная слабая связь между количеством микроорганизмов и уровнем pH ($r_s = -0,03$), солености ($r_s = -0,14$) и влажности ($r_s = -0,22$), что говорит об отсутствии достоверной связи между исследуемыми параметрами и можно судить лишь только о наличии соответствующей тенденции. Также было выявлено, что средняя влажность является фактором, влияющим на общее количество микроорганизмов. **Выводы.** С увеличением удаленности от озера уменьшается среднее значение химико-физических параметров солончаковой почвы, а общее количество микроорганизмов увеличивается. Проведенный анализ не выявил зависимости между количеством микроорганизмов и параметрами солончаковой почвы (pH, соленость и влажность) в точках на определенной глубине, но сравнительно средние параметры, установлено, что общее количество микроорганизмов уменьшается с увеличением влажности. **Ключевые слова:** солончаковые почвы, микроорганизмы, соленость, влажность, щелочность

© М.Д. Цулукидзе, 2021



Интерес к засоленным почвам и экстремофильным прокариотам в последние годы исключительно высок из-за их биологической уникальности [2, 14, 12] и возможностей использования в биотехнологии [1, 4, 13, 15]. В солёных водоёмах и засоленных почвах обитают галофильные и галотолерантные микроорганизмы. Высокие концентрации хлорида натрия необходимы им для поддержания структурной целостности цитоплазматической мембраны и функционирования связанных с ней ферментных систем [11].

С этой стороны интересным объектом является микробиота солончаков уникального озера Кумиси (Грузия), которое расположено в Нижне-карталинской низменности, в так называемой Кумисской впадине. Это озеро интересно тем, что до середины прошлого века на месте озера Кумиси находилось небольшое (0,48 км²) солёное озеро (глубиной 50 см) псевдокарстового происхождения, вода которого содержала глауберову соль и озеро невозможно было использовать в хозяйственных целях. Поэтому в 1960-ых годах озеро заполнили водой из реки Куры; уровень воды поднялся и озеро стало пресным, что изменило солёность почв, прилегающих к озеру и в свою очередь оказало влияние на микробиоту почвы, которая характеризуется наличием сульфатного засоления с преобладанием глауберовой соли [18, 19, 20]. Ввиду малой изученности этого озера, целесообразным представляется изучение микробиоты почв, прилегающих к озеру Кумиси.

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования являлось выявление особенностей распространения микроорганизмов отдельных физиологических групп в солончаковых почвах, прилегающих к озеру Кумиси.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись солончаковые почвы, прилегающие к юго-западному берегу озера Кумиси. Изучался горизонт А (глубины 5–20 см). Были взяты 9 проб из трех точек – у берега на расстоянии 50, 100 и 200 м, на глубинах 5, 10 и 20 см в мае 2019 года в условиях следующих метеорологических показателей: переменная облачность, юго-восточный ветер 7 м/сек, атмосферное давление – 724 мм/рт. ст., температура –30 °С, влажность воздуха – 64%. Место отбора и почти все побережье озера Кумиси покрыто специфическими растениями галофитами: *Chenopodium album* L., *Artemisia fragrans* Willd., *Adonis bienertii* Butkov, *Suaeda altissima* L., *Petrisimoni abrachiata* Pall. [21].

Определялись распространенные в микробиоте почвы следующие физиологические группы микроорганизмов: аммонификаторы, целлюлозоразрушающие микроорганизмы, микробное число почвы, амилитические бактерии, актиномицеты, нитрифицирующие бактерии I и II фазы, грибы, а также изучали количественный состав микроорганизмов и его взаимосвязь с влажностью, рН и солёностью почвы.

Количественное определение аммонификаторов проводили на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре 28 °С в течение 4 суток, аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов – на среде Имшенецкого-Солнцевой, микробное число почвы – на мясо-пептонном агаре (МПА) при температуре 28 °С в течение 2-х суток, амилитических бактерий и актиномицетов – на среде Чапека, нитрифицирующих бактерий I и II фазы – на соответствующих



средах Виноградского, грибов – на модифицированной среде Чапека-Докса [7, 9, 17].

Образцы высевали в 3-кратной повторности из определенного серийного разведения почвы, соответствующего каждой трофической группе микроорганизмов (с 10^{-1} по 10^{-10}). В исследовании были использованы методы, принятые в микробиологии [3, 6–9].

Определение влажности в образцах проводилось весовым методом в сушильном шкафу (СНОЛ-3,5-И1, СССР) [10] рН определяли потенциометрически с помощью рН-метра (марка рНер2, Китай), соленость – методом определения плотного остатка водной вытяжки.

Подсчет микроорганизмов на жидких питательных средах проводили с использованием таблиц Мак-Креди, а на твердых питательных средах визуально, учетом образованных колоний, проводя подсчет колоний на чашках Петри, осуществляя пересчет на 1 г абсолютно сухой почвы (КОЕ/г) [9].

Для проведения корреляционного анализа определяли коэффициент корреляции Спирмена (r_s) и критерий множественной ранговой корреляции (r_w). Также были определены следующие показатели: t_r – эмпирическое значение коэффициента Стьюдента (критерия достоверности коэффициента корреляции); $t_{\text{крит}}$ – критическое значение коэффициента Стьюдента (критерия достоверности коэффициента корреляции), находили по одноименной статистической таблице; k – число степеней свободы; n – количество определений рассматриваемого показателя; p – вероятность (95%). Если $t_r < t_{\text{крит}}$, то коэффициент корреляции считали статистически не значимым, иначе – отвергали предыдущую гипотезу. Оценку коэффициентов проводили с использованием шкалы Чеддока [16].

Результаты и их обсуждение

Содержание влаги, солености и уровень рН в образцах почвы, прилегающих к берегу озера Кумиси приведено в таблице 1. Анализ результатов показывает, что на юго-западной части территории, прилегающей к озеру Кумиси, количество влаги в почвенных образцах различно. Так, например, в образцах почвы в 50 м от берега озера, количество влаги достаточно высоко (10,32; 22,49 и 22,98%, соответственно), по сравнению с более удаленными точками. Вместе с тем, отмечается тенденция – чем дальше точка взятия образца от озера, тем меньше количество влаги в нем (табл. 1). Количество влаги очень низко в образцах почвы, взятых на склонах возвышенности, прилегающей к озеру (табл. 1). Также уменьшается уровень солености (2,15–0,60%) и кислотности (7,6–7,0) на глубинах с увеличением удаленности от озера. Вместе с тем, увеличивается общее количество микроорганизмов, которое максимально в 200 м от берега озера (табл. 2, 3, 4).

Выявлена положительная высокая корреляционная связь между уровнем рН, солености и влажности ($r_w = 0,81$) (рис. 1).

Корреляционный анализ показал, что существует отрицательная слабая связь между количеством микроорганизмов и уровнем рН ($r_s = -0,03$), солености ($r_s = -0,14$) и влажности ($r_s = -0,22$), что говорит об отсутствии достоверной



Таблица 1

Химико-физические параметры образцов почв, прилегающих к озеру Кумиси*

Table 1

Chemical and physical parameters in salinity soil samples of Kumisi Lake

Показатели	Расстояние от берега озера (м)								
	50			100			200		
	Глубина (см)			Глубина (см)			Глубина (см)		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Влажность, %	10,32	22,49	22,98	8,84	9,80	10,17	7,56	10,01	10,01
Соленость, %	1,74	1,25	2,15	0,70	0,60	0,85	0,67	0,71	0,75
pH, ед.	7,3	7,6	7,3	7,2	7,1	7,6	7,1	7,0	7,1

Примечание: *Измерения проводились однократно

связи между исследуемыми параметрами и можно судить лишь только о наличии соответствующей тенденции.

Также было выявлено, что средняя кислотность не может считаться фактором, влияющим на общее количество микроорганизмов ($r=-0,79$; $t_r < t_{\text{крит}} = 2,1 < 12,70615$; коэффициент корреляции статистически не значим), также средняя влажность оказывает влияние на этот параметр ($r=0,99$; $t_r > t_{\text{крит}} = 49,75 > 12,70615$; коэффициент корреляции статистически значим) (рис. 2, 3, 4). Средняя соленость, несмотря на высокий коэффициент корреляции ($r=-0,99$), не влияет на общее количество микроорганизмов, в этом случае, скорее всего, мы имеем дело с ложной корреляцией, так как соленость угнетает распространение микроорганизмов. С уменьшением средней влажности ($r=-0,99$) происходит уменьшение общего количества микроорганизмов.

В исследуемых образцах почвы (50 м от берега) доминируют аммонификаторы (63,16%). В большом количестве представлены амилитические бактерии (31,56%). Многочисленность аммонифицирующей микробиоты является показателем наличия в почве высокой концентрации легко окисляемых органических веществ. Достаточно высокий показатель численности амилитической микробиоты, скорее всего связан с экссудативными выделениями корневой системы растений. В меньшем количестве представлено микробное число почвы (5,28%), что свидетельствует о том, что в почве присутствуют в большом количестве остатки жизненного функционирования растений и животных (табл. 2).

В образцах почвы, взятых в 100 м от берега, доминируют аммонификаторы (56,80%) и амилитические бактерии (42,88%). В меньшем количестве также представлено микробное число почвы (0,32%) (табл. 3).

В образцах почвы, взятых на расстоянии 200 м от берега озера доминируют аммонификаторы (47,94%). В меньшем количестве представлены амилитические бактерии (47,30%) и микробное число почвы (4,79%) (табл. 4).



Таблица 2
Table 2

Содержание микроорганизмов в солончаковых почвах озера Кумиси (50 м от озера)*
The content of the certain trophic groups in salinity soils of Kumisi Lake (50 m from the lake)

Группы микроорганизмов	Глубина 5 см		Глубина 10см		Глубина 20см		Общее количество микроорганизмов (КОЕ/г)	%
	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%*	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%		
<i>Аммонификаторы</i>	64400(±408)	86,52	32420 (± 37,4)	41,35	2051 (± 60,8)	54,85	98871×10 ⁶ (±425,5)	63,14
<i>Амилитические бактерии</i>	5575 (±21,2)	7,49	465060 (±10600)	55,94	0,00	0,00	49435×10 ⁶ (±25,2)	31,57
<i>Актиномицеты</i>	0,0468 (±0,00007)	0,0001	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0468×10 ⁶ (±0,00007)	0,00003
<i>Грибы</i>	0,2081 (±0,00007)	0,0003	0,0482(± 0,00117)	0,0001	0,9522 (± 0,03)	0,03	1,2085×10 ⁶ (±0,03)	0,0008
<i>Целлюлозоразрушающие микроорганизмы</i>	0,24 (±0,000070)	0,0003	0,34 (± 0,004892)	0,0004	0,31 (±0,000426)	0,01	907894(±0,005)	0,0006
<i>Сапрофиты</i>	4460 (±7)	5,99	2128 (±700)	2,71	1687 (± 7,2)	45,11	8275×10 ⁶ (±714,2)	5,28
<i>Нитрификаторы (фаза I)</i>	0,00025(±0,000005)	0,0000003	0,0109(± 0,00077)	0,00001	0,1415 (± 0,00742)	0,004	0,1527×10 ⁶ (±0,008)	0,0001
<i>Нитрификаторы (фаза II)</i>	0,8920 (±0,00021)	0,001	0,1671 (± 0,02)	0,0002	0,0902 (± 0,00014)	0,002	1,1493×10 ⁶ (±0,02)	0,0007
Общее число микроорганизмов	7,44×10 ¹⁰	100	7,84×10 ¹⁰	100	3,74×10 ⁹	100	1,57×10 ¹¹	100

*Примечание для таблиц 2 – 4: процентное (%) содержание микроорганизмов в почве рассчитывали по отношению к общему числу микроорганизмов на каждой глубине и к суммарному общему числу микроорганизмов на глубинах



Таблица 3

Содержание микроорганизмов в солончаковых почвах озера Кумиси (100 м от озера)

Table 3

The content of the certain trophic groups in salinity soils of Kumisi Lake (100 m from the lake)

Группы микроорганизмов	Глубина 5 см		Глубина 10 см		Глубина 20 см		Общее количество микроорганизмов (КОЕ/г)	%
	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%		
<i>Аммонификаторы</i>	60333 (±142)	62,40	24390(±4,1)	49,44	2450(±20,4)	6,82	87173×10 ⁶ (±496,4)	47,91
<i>Амилитические бактерии</i>	32900 (±1560)	34,03	22727(±212)	46,07	30494(±2,27)	84,82	86121×10 ⁶ (±1774,27)	47,33
<i>Актиномицеты</i>	0,1536(±0,00028)	0,0002	0,2938(±0,00093)	0,0006	0,1224(±0,00184)	0,0003	0,5698×10 ⁶ (±0,003)	0,0003
<i>Грибы</i>	0,0022(±0,000004)	0,000002	0,0026(±0,00029)	0,00001	0,0089(±0,00014)	0,00002	0,0137×10 ⁶ (±0,0004)	0,00001
<i>Целлюлозоразрушающие микроорганизмы</i>	0,19(±0,003422)	0,0002	0,17(±0,000438)	0,0004	0,21(±0,000028)	0,0006	588600(±3889,1)	0,0003
<i>Сапрофиты</i>	3448(±35)	3,57	2217(±71)	4,49	3005(±28)	8,36	8670×10 ⁶ (±134)	4,76
<i>Нитрификаторы (фаза I)</i>	0,154(±0,00071)	0,0002	0,249(±0,00071)	0,001	0,195(±0,00354)	0,001	0,5980×10 ⁶ (±0,005)	0,0003
<i>Нитрификаторы (фаза II)</i>	0,0004(±0,00007)	0,0000004	0,7649(±0,00071)	0,002	0,0161(±0,00064)	0,00004	0,7814×10 ⁶ (±0,001)	0,0004
Общее число микроорганизмов	9,67×10 ¹⁰	100	4,93×10 ¹⁰	100	3,59×10 ¹⁰	100	1.82×10 ¹¹	100

Таблица 4
Table 4Содержание микроорганизмов в солончаковых почвах озера Кумиси (200 м от озера)
The content of the certain trophic groups in salinity soils of Kumisi Lake (200 m from the lake)

Группы микроорганизмов	Глубина 5 см		Глубина 10 см		Глубина 20 см		Общее количество микроорганизмов (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%
	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%	Количество (1×10 ⁶ КОЕ/г)	%		
<i>Аммонификаторы</i>	88700 (±40,8)	89,81	9120(±32,6)	19,71	2033 (±6,9)	5,21	99853×10 ⁶ (±49)	54,22
<i>Амилитические бактерии</i>	8654 (±0,4)	8,76	33252 (±1,22)	71,87	33480 (±350)	85,80	75386×10 ⁶ (±351,62)	40,94
<i>Актиномицеты</i>	0,1893(±0,00049)	0,0002	0,1279 (±0,00031)	0,0003	0,00	0,00	0,3172×10 ⁶ (±0,0008)	0,0002
<i>Грибы</i>	0,028 (±0,00141)	0,00003	0,0041 (±0,00003)	0,00001	0,0026 (±0,00028)	0,000007	0,0347×10 ⁶ (±0,0017)	0,00002
<i>Целлюлозоразрушающие микроорганизмы</i>	0,09 (±0,000353)	0,0001	0,06 (±0,000056)	0,02	0,05 (±0,000141)	0,0001	224280(±551,6)	0,0001
<i>Сапрофиты</i>	1406 (±7,3)	1,42	3893 (±141)	8,41	3509 (±28)	8,99	8808×10 ⁶ (±176,30)	4,78
<i>Нитрификаторы (фаза I)</i>	0,584 (±0,00410)	0,001	0,0656 (±0,00056)	0,0001	0,0036 (±0,000002)	0,00001	0,65×10 ⁶ (±0,005)	0,0004
<i>Нитрификаторы (фаза II)</i>	0,038 (±0,00049)	0,00004	1,051 (±0,12)	0,0023	0,0234 (±0,00028)	0,00006	1,11×10 ⁶ (±0,12)	0,06
Общее число микроорганизмов	9,88×10 ¹⁰	100	4,63×10 ¹⁰	100	3,90×10 ¹⁰	100	1,84×10¹¹	100



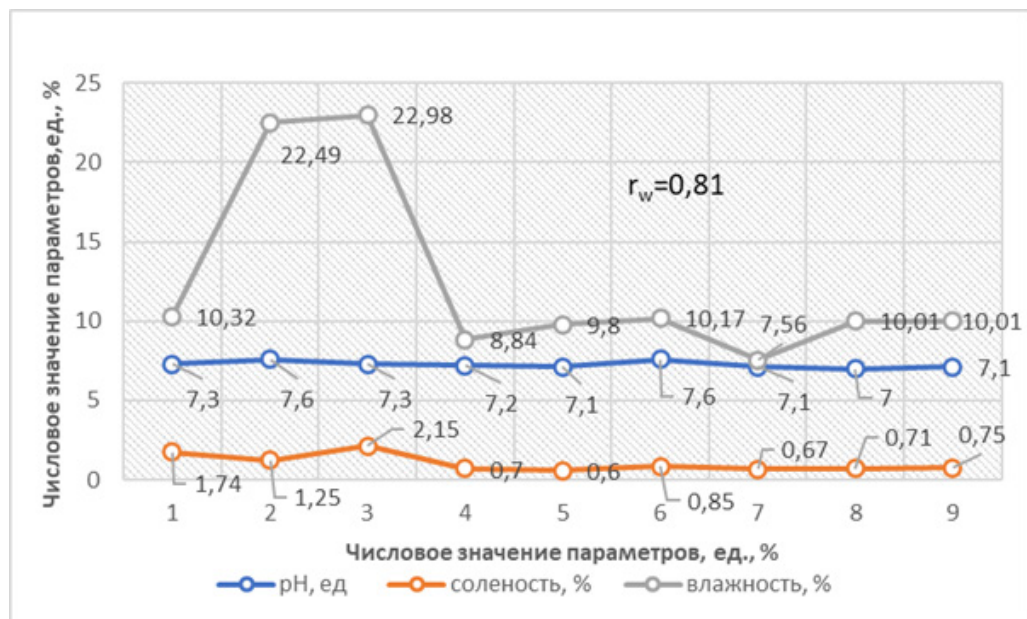


Рис. 1. Корреляционная связь между уровнем pH, солености и влажности

Fig. 1. Correlation between pH, salinity and humidity levels

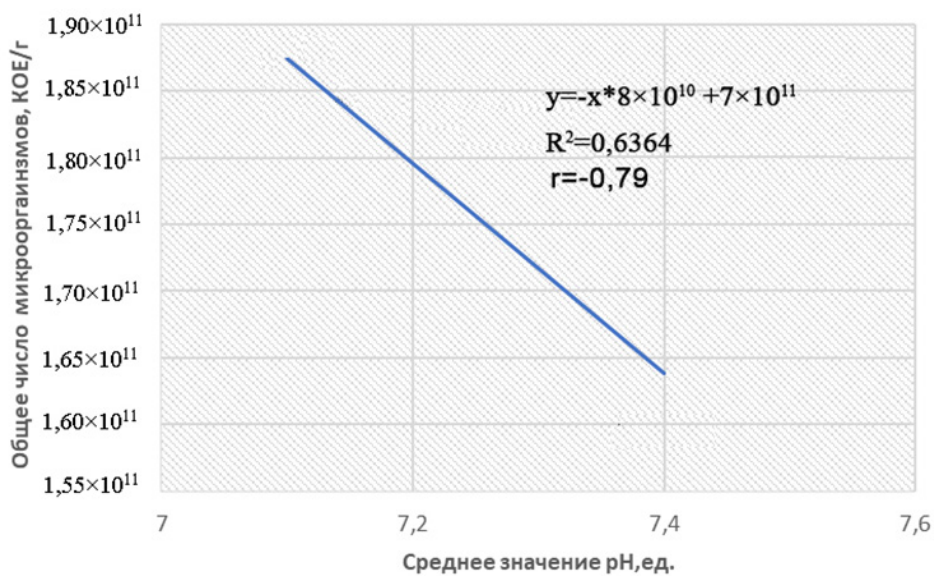


Рис. 2. Зависимость общего количества микроорганизмов от среднего pH почвы

Fig. 2. Dependency of total number of microorganisms from average soil acidity

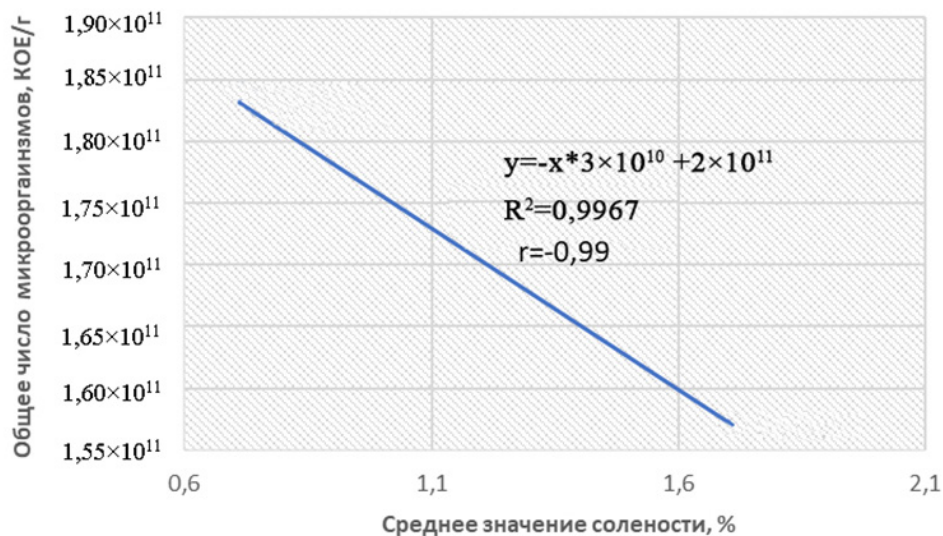


Рис. 3. Зависимость общего количества микроорганизмов от средней солёности почвы

Fig. 3. Dependency of total number of microorganisms from average soil salinity

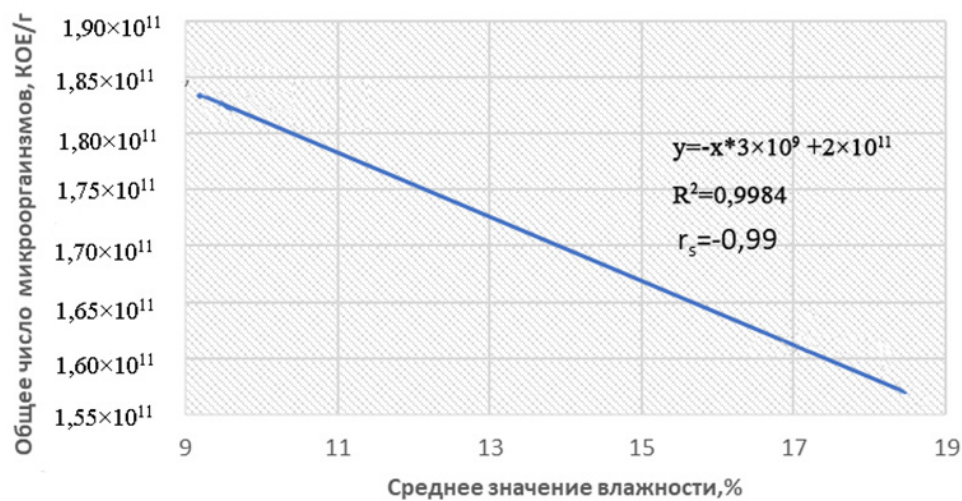


Рис. 4. Зависимость общего количества микроорганизмов от средней влажности почвы

Fig. 4. Dependency of total number of microorganisms from average soil humidity

В исследуемых образцах в очень малом количестве представлены целлюлозоразрушающие микроорганизмы, грибы, актиномицеты, нитрифицирующие бактерии I и II фазы (табл. 2, 3, 4).

Амилолитики имеют высокую численность по профилю практически во всех изученных образцах почвы. По-видимому, рост амилолитических



микроорганизмов ассоциирован с корневым экссудатом растений [5]. Учитывается также то, что у озера Кумиси корневая система растений-галофитов пронизывает почву на большую глубину. Высокая численность аммонификаторов указывает на присутствие в почвах высоких концентраций легкоокисляемых органических веществ.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

- В профиле почвы доминируют аммонификаторы, в большом количестве представлены амилотические бактерии, остальные трофические группы представлены в малом количестве, что свидетельствует о низком уровне минерализации почвы.
- С увеличением удаленности от озера уменьшается среднее значение химико-физических параметров солончаковой почвы, а общее количество микроорганизмов увеличивается.
- Проведенный анализ не выявил зависимости между количеством микроорганизмов и параметрами солончаковой почвы (рН, соленость и влажность) в точках на определенной глубине, но сравнивая средние параметры, выявлено, что общее количество микроорганизмов уменьшается с уменьшением влажности.

M.D. Tsulukidze

Sokhumi State University,
26 Ana Politkovskaia Street, 0186, Tbilisi, Georgia

DISTRIBUTION OF SOME PHYSIOLOGICAL GROUPS OF MICROORGANISMS IN SALINE SOILS ADJACENT TO KUMISI LAKE (GEORGIA)

Summary

Aim. The study of distribution features of microbial associations of saline soils adjacent to Lake Kumisi. **Methods.** Quantitative determination of ammonifiers was performed on meat-peptone agar (MPA), of aerobic cellulose-decomposers – on Imshenetski-Solntseva medium area, total microbial count of microorganisms (other saprophytic microflora) – inoculation on MPA after 2 days of incubation at temperature 28°C, an amylolytic bacteria and actinomycetes – on Czapek medium, nitrifying bacteria (phase I and II) – on Vinogradski mediums, fungi – on modified Czapek-Dox medium. The moisture content of soil samples was measured in a drying chamber by the gravimetric method, the pH value was determined potentiometrically using a portable pH meter (manufacturer pHep2, China), and salinity was determined by the solid residue of the aqueous extract. Quantitative estimation of microorganisms in liquid media was conducted using the Mc Credie table, and in solid areas visually by the registration of the colonies, counting colonies on Petri dishes, recalculating per 1 g of absolutely dry soil. **Results.** The qualitative and quantitative ratio of microorganisms within each physiological group and between them has been established. In the test samples ammonifying and amylolytic bacteria dominate. Total microbial count are found in smaller amounts, in small amount are found cellulose decomposers, fungi, actinomycetes, phase I and II nitrifies. Correlation analysis showed that there is a negative weak relationship



between the number of microorganisms and the level of pH ($r_s = -0.03$), salinity ($r_s = -0.14$) and humidity ($r_s = -0.22$), which indicates the absence of a reliable relationship between the studied parameters and it is possible to judge only about the presence of the corresponding trend. It was also found that the average humidity are factors affecting the total number of microorganisms. **Conclusions.** With increasing distance from the lake, the average value of the chemical and physical parameters of the saline soil decreases, and the total number of microorganisms increases. The analysis did not reveal a relationship between the number of microorganisms and the parameters of saline soil (pH, salinity and humidity) at certain depth points, but in comparing with the average parameters, it was found that the total number of microorganisms decreases with increasing humidity.

Key words: Saline soils, Microorganisms, Salinity, Humidity, Alkalinity

М.Д. Цулукидзе

Сухумський державний університет,
вул. Ганни Політковської, 26, Тбілісі, 0186, Грузія,
тел.: +995(32) 254 16 53, e-mail: tsulukidzemziya@gmail.com

ПОШИРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ОКРЕМИХ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ГРУП В СОЛОНЧАКОВИХ ГРУНТАХ, ЩО ПРИЛЯГАЮТЬ ДО ОЗЕРА КУМІСІ (ГРУЗІЯ)

Реферат

Мета. Вивчення особливостей поширення мікроорганізмів окремих фізіологічних груп в солончакових ґрунтах, що прилягають до озера Кумісі. **Методи.** Кількісний склад аммоніфікаторів визначали на м'ясо-пептонному агарі (МПА), аеробних целюлозоруйнівальних мікроорганізмів – на середовищі Імшенецького-Солнцевої, мікробного числа – на м'ясопептонному агарі (МПА), амілолітичних бактерій I та II фази – на відповідних середовищах Виноградського, грибів – на модифікованому середовищі Чапека-Докса. Визначення вологості в зразках ґрунтів визначали ваговим методом, рН – потенціометрично з допомогою рН-метра, солоність – методом визначення щільного залишку водної витяжки. Кількість мікроорганізмів визначали на рідких живильних середовищах з використанням таблиць Мак-Креді, а на твердих живильних середовищах візуально, обліком утворених колоній на чашках Петрі з перерахунком на 1 г абсолютно сухого ґрунту. **Результати.** Встановлено якісне і кількісне співвідношення мікроорганізмів всередині кожної фізіологічної групи і між ними. Кількісно найбільше представлені амоніфікатори та амілолітичні бактерії. В меншій кількості зустрічаються решта сапрофітів, невеликою кількістю представлені целюлозоруйнівальні мікроорганізми, гриби, актиноміцети, нітрифікувальні бактерії I та II фази. Кореляційний аналіз показав, що існує зворотний слабкий зв'язок між кількістю мікроорганізмів та рівнем рН ($r_s = -0,03$), солоності ($r_s = -0,14$) і вологості ($r_s = -0,22$), що свідчить про відсутність достовірного зв'язку між досліджуваними параметрами і можна судити лише тільки про наявність відповідної тенденції. Також було виявлено, що середня вологість є



чинником, який впливає на загальне число мікроорганізмів. **Висновки.** Із зростанням віддаленості від озера зменшується середнє значення хіміко-фізичних параметрів солончакового ґрунту, а загальна кількість мікроорганізмів збільшується. Проведений аналіз не виявив залежності між кількістю мікроорганізмів і параметрами солончакового ґрунту (рН, солоність та вологість) в точках на певній глибині, але порівнянням середніх параметрів встановлено, що загальна кількість мікроорганізмів зменшується із збільшенням вологості.

Ключові слова: солончакові ґрунти, мікроорганізми, солоність, вологість, лужність

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Апхазова И.С.* Грузинская Советская Энциклопедия, Том 6, Тбилиси: Специальная Научная Редакция, 1983 – 720 с.
2. *Грузина В.Д., Галатенко О.А., Сумарукова И.Г., Ефременкова О.В., Терехова Л.П.* Метод увеличения количества выделяемых актиномицетов, основанный на предварительном внесении в образцы почв водных суспензий бактерий // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 42–48.
3. *Зенова Г.М., Оборотов Г.В., Звягинцев Д.Г.* Солончаки – местообитание галофильных и алкалолотерантных стрептомицетов // Почвоведение. – 2005. – № 11. – С. 1341–1344.
4. *Какауридзе Т.Г.* Качественный и количественный состав планктона и бентоса озера Кумиси и их изменение в течение года // Труды Института зоологии Академии Наук Грузинской ССР. – 1953. – Т. 12. – С. 103–121.
5. *Лысак Л. В., Трошин Д. В., Чернов И. Ю.* Бактериальные сообщества солончаков // Микробиология. – 1994. – Т. 63. – № 4. – С. 721–729.
6. *Минеев В.Г.* Агрохимия: учеб. пособие. М.: Издательство Моск. ун-та, Издательство Колосс, 2004. – 753 с.
7. *Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Фёдорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королёва О.В.* Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. № 1. – С. 5–20.
8. *Практикум по агрохимии: 2-е издание, переработанное и дополненное* // Под редакцией академика РАСХН В. Г. Минеева. – М.: Издательство Моск. ун-та, 2001. – 688 с.
9. *Практикум по микробиологии: учеб. пособие* // Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Издательство Моск. ун-та, 1976. – 307 с.
10. *Прожорина Т.И., Затулей Е.Д.* Химический анализ почв: Лабораторный практикум для вузов. Часть 2. Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2009. – 31 с.
11. *Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии: учеб. пособие. М.: Издательство Дрофа, 2004. – 256 с.
12. *Терпелец В.И., Слюсарев В.Н.* Агрофизические и агрохимические методы исследования почв. Учебно-методическое пособие. Краснодар: КубГАУ, 2016. – 65 с.



13. Хасенова А.Х., Айткельдиева С.А., Смирнова И.Э., Ултанбекова Г.Д., Шакиев С.Ш., Треножникова Л.П. Изучение состава и свойств актиномицетов в экстремальных экосистемах Южного Казахстана // Вестник КазНУ. Серия экологическая. –2012.– №3 (35). – С. 79–85.
14. Duangmal K., Suksaard P., Pathom-aree W., Mingma R., Matsumoto A., Takahashi Y. *Actinopolysporasalinaria sp. nov.*, a halophilic actinomycete isolated from solar saltern soil // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. –2016.–№ 66. – P. 1660–1665.
15. Saratale G., Oh S. Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardioopsis sp.* KNU. //Biodégradation. –2011.– Vol. 22. № 5. – P. 905–919.
16. Tang S. K., Li W. J., Dong W., Zhang Y. G., Xu L. H., Jiang C L. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils // Actinomycetologica. – 2003.– Vol. 17. –P. 6–10.
17. Yoshida, F., Yamane T. Continuous hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. A kinetic model for two-liquid phase culture. // Biotechnology Bioengineering. – 1974.–V. 16. № 5.–P. 635–657.
18. <https://medstatistic.ru/methods/methods9>. 25 December 2020.
19. https://dommedika.com/medicinskaia_mikrobiologia/opredelenie_mikrobnogo_chisla_pochvi. 29 September 2019.
20. <https://travelingeorgia.com/ru/resorts/resort-kumisi>. 19 April 2020.
21. Badridze G., Chanishvili Sh., Chkhubianishvili E., Kacharava N., Rapava L., Kikvidze M., Chigladze L. Halophylic plants of the East Georgia (physiological and biochemical analysis). Tbilisi: Print House Damani, 2019:93 [in Georgian].

REFERENCES

1. Apkhazava IS. Georgian Soviet Encyclopedia, V.6, Tbilisi: Specialnaya nauchnaya redakciya, 1983:720 [in Russian].
2. Gruzina VD., Galatenko OA, Sumarukova IG, Efremenkova OV, Terekhova LP. The method of increasing the amount of excreted actinomycetes based on the preliminary introduction of aqueous suspensions of bacteria into soil samples. Biotechnologiya. 2003; 4: 42-48[in Russian].
3. Zenova GM., Oborotov GV., Zvyagintsev DG. Solonchaks: the ecotopes of halophilic and alkalotolerant streptomycetes. Pochvovedeniye. 2005; 11: 1341-1344 [in Russian].
4. Kakauridze TG. The qualitative and quantitative composition of the plankton and benthos of Lake Kumisi and their change during the year. Proceedings of the Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Georgian SSR. 1953; 12: 103-121[in Russian].
5. Lysak LV, Troshin DV., Chernov IYu. Bacterial communities of solonchaks. Mikrobiologiya. 1994; 63(4): 721–279[in Russian].
6. Mineev VG. Agrochemistry: manual. – M.: Izdatelstvo Moscovskogo universiteta, Izdatelstvo Koloss, 2004: 753 [in Russian].



7. Morozkina EV, Slutskaia ES, Fedorova TV, Tugay TI, Golubeva LI, Koroleva OV. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya*. 2010; 46(1): 5–20 [in Russian].
8. Manual on agrochemistry: 2nd edition/ Pod red. VG. Mineeva. M: Izdatelstvo Mosk. Universiteta, 2001:688 [in Russian].
9. Manual on microbiology/ Pod red. NS. Egorova. M: Izdatelstvo Mosk. Universiteta, 1976:307 [in Russian].
10. Prozhorina TI, Zatul'ev ED. Chemical analysis of soil: Laboratory workshop for universities. Vol.2. Voronezh: Izdatel'sko-poligraficheskij centr Voronezhskogo Gosudarstvennogo Universiteta, 2009:31 [in Russian].
11. Tepper EZ, Shilnikova VK, Pereverzeva GI. Manual on microbiology. M: Izdatelstvo Drofa, 2004:256 [in Russian].
12. Terpelets VI, Slusarev VN. Agrophysical and agrochemical methods of soil investigation. Manual. Krasnodar: KubGAU, 2016:65 [in Russian].
13. Khassenova AKh, Aitkeldiyeva SA, Smirnova IE, Ultanbekova GD, Shakiyev SSh, Trenozhnikova LP. Study of composition and properties of actinomycetes in extreme ecosystems of south Kazakhstan. *Vestnik KazNU. Seriya ekologicheskaya*. 2012; 3(35):79-85 [in Russian].
14. Duangmal K, Suksaard P, Pathom-aree W, Mingma R, Matsumoto A, Takahashi Y. Actinopolysporasalinaria sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from solar saltern soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016; 66:1660–1665 [in Russian].
15. Saratale G, Oh S. Production of thermotolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardia* sp. *KNU. Biodégradation*. 2011; 22(5): 905–919 [in Russian].
16. Tang SK, Li WJ, Dong W, Zhang YG, Xu LH, Jiang CL. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetologica*. 2003; 17: 6-10 [in Russian].
17. Yoshida, F, Yamane T. Continuous hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. A kinetic model for two-liquid phase culture. *Biotechnology Bioengineering*. 1974; 16: 5: 635–657.
18. <https://medstatistic.ru/methods/methods9>. 25 December 2020.
19. https://dommedika.com/medicinskaia_mikrobiologia/opredelenie_mikrobnogo_chisla_pochvi. 29 September 2019.
20. <https://travelingeorgia.com/ru/resorts/resort-kumisi>. 19 April 2020.
21. Badridze G, Chanishvili Sh, Chkhubianishvili E, Kacharava N, Rapava L, Kikvidze M, Chigladze L. Halophylic plants of the East Georgia (physiological and biochemical analysis). Tbilisi: Print House Damani, 2019:93 [in Georgian].

Стаття надійшла до редакції 02.02.2021 р.



**Н.Ю. Васильєва, Г.В. Ямборко, А.Г. Мерліч,
І.В. Страшнова, І.П. Метеліцина**

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

**ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНУ
ENTEROCOCCUS ITALICUS ONU 547
ТА ЕФІРНИХ ОЛІЙ НА РІСТ
УМОВНО-ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Мета. Оцінити вплив бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU 547 та ефірних олій окремо та в комбінації до тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. **Методи.** Антагоністичну активність бактеріоцину та ефірних олій визначали за показником оптичної щільності суспензії бактерій тест-штамів (*Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Індекс фракційної пригнічувальної концентрації (FIC) розраховували шляхом складання значень FIC бактеріоцину *E. italicus* ONU 547 і дослідних ефірних олій. **Результати.** Максимальний антимікробний ефект спричиняли ефірні олії Анісу лікарського (*Anisum officinalis*) та Меліси лікарської (*Melissa officinalis*), які пригнічували ріст тест-штамів більше ніж на 50,0%. При використанні бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU 547 пригнічення життєздатності індикаторних штамів не перевищувало 30,0%. Дослідні комбінації ефірних олій та бактеріоцину спричиняли 4 типи наслідків: ефект синергії; адитивний ефект; антагоністичний ефект; інтерактивний ефект (відсутність ефекту взаємодії). У більшості випадків сукупна дія бактеріоцину та ефірних олій спричиняла адитивний ефект. **Висновки.** Це дослідження продемонструвало потенціал використання різних комбінацій природних протимікробних сполук. Отримані результати надають підстави для подальшої розробки та оптимізації комбінацій ефірних олій і пробіотичних штамів мікроорганізмів з метою використання у харчових та фармацевтичних біотехнологіях.

Ключові слова: антимікробна активність, ефірні олії, бактеріоцин

Сучасні біотехнологічні виробництва стикаються з необхідністю розробки нових підходів при виготовленні продуктів харчування для людини або харчових добавок у тваринництві, які стануть альтернативою антибіотиків.

Використання бактеріальних антимікробних пептидів (бактеріоцинів) як натуральних харчових консервантів одне з таких рішень. Бактеріоцини відрізняються від класичних антибіотиків трьома основними властивостями: синтез бактеріоцинів відбувається на рибосомах, бактеріоцини мають специфічний спектр дії, кожен бактеріоцин має свій власний спеціалізований імун-



ний білок [5]. Серед досліджених бактеріоцинів значну нішу займають ентероцини, які синтезують штами ентерококів [4]. Ентероцини представляють великий інтерес через їх антимікробну активність щодо таких патогенних бактерій як *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp* [4]. Штам *E. italicus* ONU547 був ізольований співробітником кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова Мерлічем А. Г. [14]. Бактеріоцин, вироблений цим штамом, виявляв антимікробну активність щодо *L. sakei subsp. sakei* JCM 1157, *Brochothrix thermosphacta* DSMZ 20171 та *Listeria ivanovii subsp. ivanovii* DSMZ 20750. Молекулярна маса бактеріоцинів або компонентів одного бактеріоцину, виробленого *E. italicus* ONU547, становила приблизно 2 та 3 кДа [14].

Крім того, в останні роки збільшилася кількість досліджень щодо вивчення антимікробної активності ефірних олій, які, завдяки своїм потенційним антимікробним властивостям, отримали назву «фітобіотики» [3, 18]. Рядом дослідників визначено позитивний вплив ефірних олій на організм людини і тварин, зокрема на процеси травлення (стимуляція утворення ферментів), причому ефірні олії не пригнічують ріст представників кишкової нормобіоти [7, 11, 17]. Тому нові біотехнологічні препарати на основі комбінацій ефірних олій з пробіотичними штамми бактерій або з бактеріоцинами можуть бути гідним доповненням до антибіотиків [1, 2, 6, 9, 16].

Ефективність використання ефірних олій у комбінації з бактеріоцинами залежить від їх оптимального дозування: невеликі концентрації ефірних олій ефективно знищують хвороботворні мікроорганізми, не завдаючи шкоди корисним бактеріям, які мешкають у кишківнику людини. Цей феномен уможливує одночасне введення бактеріоцинів або бактеріоциногенних штамів і ефірних олій для лікування кишкових розладів людини, викликаних патогенними мікроорганізмами; можливо також сукупне додавання бактеріоцинів і ефірних олій у кисломолочні продукти (ароматизовані напої або йогурти) [13, 20].

Однак, протимікробна активність природних ефірних олій різного походження істотно відрізняється, а також суттєво залежить від бактерії-мішені. Тому створення комбінації ефірних олій та бактеріоцинів є важливим для розробки препаратів з метою використання у харчових та фармацевтичних біотехнологіях, а також для контролю збудників псування харчових продуктів та харчових отруень.

Метою роботи була оцінка впливу бактеріоцину штаму *Enterococcus italicus* ONU 547 та ефірних олій окремо та в комбінації проти тест-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали та методи

В роботі були використані тест-штами: *Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, отримані з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Штами культивували на МПА (м'ясо пептонний агар) при



37 °С та зберігали при 4 °С. Усі експерименти із тест-штамами проводили на середовищі LB (Лурія-Бертані) такого складу (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0, агар -11,0 г/л.

Для отримання безклітинного супернатанту що містить бактеріоцин, штам *Enterococcus italicus* ONU 547 культивували в рідкому середовищі MRS при 30 °С протягом 17 год. Отриману нічну культуру центрифугували при 10000 g протягом 15 хвилин, з подальшою нейтралізацією 1 М NaOH та стерилізацією при 100 °С протягом 10 хвилин на водяній бані [4, 9, 14].

Для експерименту були обрані ефірні олії (ЕО) фірми «Лія» шести рослин (Полин солянковидний, Чебрець садовий, Аніс лікарський, Чайне дерево, Ялиця сибірська, Меліса лікарська), вибір яких був зумовлений їх анти-мікробним потенціалом до патогенних мікроорганізмів [10]. Основні активні речовини дослідних ефірних олій наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Активні речовини ефірних олій, що використовували при дослідженні (основні складові) [10]

Table 1

Active substances of essential oils used in the study (main components) [10]

Джерело ефірної олії (ЕО)	Основні активні речовини
Полин солянковидний (<i>Artemisia salsoloides</i>)	Лімонен, транс-β-оцімен, цис-β-оцімен, α-пінен, β-мірцен, β-пінен.
Чебрець садовий (<i>Thymus vulgaris</i>)	Ліналоол, ліналілацетат
Аніс лікарський (<i>Anisum officinalisa</i>)	Анетол, метилхавікол, α-фелландрен, лімонен, дипентен, α-пінен, камфен, γ-бісаболен, β-фарнезен, γ-гімахален, куркума, анісовий альдегід, аніскетон, гідрохінон, п-креозол, пропіонова, масляна, міристинова і анісова кислоти
Чайне дерево (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Терпінен-4-ол, γ-терпінен, α-терпінен, 1,8-цинеол, α-терпінолен, α-терпінеол, α-пінен та р-цімол
Ялиця сибірська (<i>Abies sibirica</i>)	Мірцен, цис- і транс-β-оцімен, лімонен, дипентен, терпени, терпінолен, α- і β-пінени, камфен, α-туйен, α-фенхен, 3-карен, γ-бісаболен п-цимол, борнеол, цинеол, деканаль, додекан
Меліса лікарська (<i>Melissa officinalis</i>)	Мірцен, ліналоол, камфора, цитронелаль, β- каріофілен, оксид каріофілен, цитраль

Для приготування суміші ефірних олій використовували 0,4% (вага/об'єм) ефірної олії, 0,5% (вага/об'єм) Твін 20 і 6,0% (вага/об'єм) диметилсульфоксиду (ДМСО) і доводили на шейкері-інкубаторі при 200 об/хв протягом 30 хв до стану емульсії. Твін 20 і ДМСО використовували для стабілізації емульсії. Всі ці речовини змішували у стерильних умовах у рідкому середовищі LB (кінцевий об'єм 10 мл) [19].

Для визначення антагоністичної активності ефірних олій і бактеріоцину, при їх окремому використанні, в кожен лунку 96-лункового мікропланшету додавали 100 мкл середовища LB, 50 мкл нічної культури тест-штамів



бактерій та 100 мкл речовини, яку тестували. Як контроль використовували середовище LB (200 мкл) з додаванням нічної культури тест-штаму (50 мкл) [19].

Для визначення антагоністичної активності ефірних олій і бактеріоцину, при їх сумісному використанні, в кожному лунку 96-лункового мікропланшету додавали 100 мкл середовища LB, 50 мкл нічної культури тест-штамів бактерій та 100 мкл сполуки, що містить стабілізовану емульсію ефірної олії та бактеріоцину. Як контроль використовували середовище LB (200 мкл) з додаванням нічної культури тест-штаму (50 мкл) [19].

Планшети інкубували при 37 °С протягом 24 год, після чого вимірювали оптичну щільність суспензії (за довжиною хвилі 600 нм). Усі досліди були виконані в трьох повторах на мікропланшетному спектрофотометрі μ Quant.

Для визначення синергічних ефектів ефірних олій і бактеріоцину розраховували індекс фракційної пригнічувальної концентрації (FIC) шляхом складання значень FIC бактеріоцину штаму *E. italicus* ONU 547 (a) і ефірних олій (b) таким чином [19]:

$FIC = (FICa + FICb)$, якщо

$$FICa = \frac{\text{сукупний антимікробний ефект ефірної олії та бактеріоцину}}{\text{антимікробна активність бактеріоцину}}$$

$$FICb = \frac{\text{сукупний антимікробний ефект ефірної олії та бактеріоцину}}{\text{антимікробний ефект ефірної олії}}$$

Для інтерпретації результатів використовували шкалу, де $FIC \leq 0,5$ приймали як синергічний ефект (S), $0,5 \leq FIC \leq 2$ – інтерактивний ефект (I) – відсутність ефекту взаємодії, $2 < FIC \leq 3$ – адитивний ефект (AD), $FIC > 3$ – антагоністичний ефект двох сполук, що тестували (A) [19].

Результати досліджень та їх обговорення

За результатами дослідження окремого впливу бактеріоцину та ефірних олій показано, що на тест-штам *S. enterica* NCTC 6017 максимальний вплив показала ЕО Меліси лікарської та бактеріоцину, який продукує штам *E. italicus* ONU 547. Зниження життєздатності тест-штаму склало 77,7% та 21,9%, відповідно (рис. 1). Незначне пригнічення росту (до 10,0%) індикаторного штаму *S. enterica* NCTC 6017 спостерігали при додаванні ЕО Анісу лікарського та ЕО Чебрецю садового.

Вплив дослідних ефірних олій на індикаторний штам *P. aeruginosa* ATCC 27853 був майже однаковим – зниження життєздатності клітин спостерігали в межах 23,1–32,8%. Бактеріоцину, що використовували у роботі, майже не впливав на життєздатність *P. aeruginosa* ATCC 27853 (рис. 2).

Зниження життєздатності тест-штаму *P. putida* KT 2440 до 41,0% реєстрували при використанні ЕО Меліси лікарської та до 52,1% при використанні ЕО Чайного дерева (рис. 3). Антимікробна дія бактеріоцину та ЕО Поліну солянковидного викликала пригнічення росту штаму *P. putida* KT 2440 на 18,8%.



ЕО Чайного дерева пригнічувала ріст індикаторного штаму *K. pneumoniae* ATCC 10031 на 72,3% у порівнянні з контролем, а ЕО Меліси лікарської – на 57,9% (рис. 4). ЕО Анісу лікарського та Ялиці сибірської, навпаки, стимулювали ріст індикаторного штаму на 46,5% та 58,4%, відповідно (рис. 4). Бактеріоцин, якій продукує штам *Enterococcus italicus* ONU 547, пригнічував ріст індикаторного штаму на 29,8% (рис. 4).

Було виявлено, що дослідні бактеріоцин та ефірні олії діяли майже однаково на життєздатність тест-штаму *E. coli* ATCC 25922 (рис. 5). Максимально впливали на даний тест-штам ЕО Полину солянковидного та Анісу лікарського: життєздатність кишкової палички була знижена на 43,9% та 47,7%, відповідно (рис. 5).

Досить цікаві результати були отримані за впливом ефірних олій на індикаторний штам *E. faecalis* ATCC 29212. В цьому досліді не спостерігали пригнічення росту даного штаму, навпаки – реєстрували стимуляцію його росту на 31–91,0 % (рис. 6).

При дослідженні зміни ростових показників тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 за впливом ефірних олій реєстрували антимікробну дію ЕО Анісу лікарського та ЕО Полину солянковидного – кількість життєздатних клітин тест-штаму знижувалась на 22,9 та 34,1%, відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 7).

ЕО Полину (*Artemisia*) містить монотерпени, які руйнують мембрани стафілококу золотистого та деяких видів стрептококів [12]. Бактеріоцин *Enterococcus italicus* ONU 547, навпаки, стимулював ріст тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 на 27,1%. Інші ефірні олії також спричиняли стимулювальну дію.

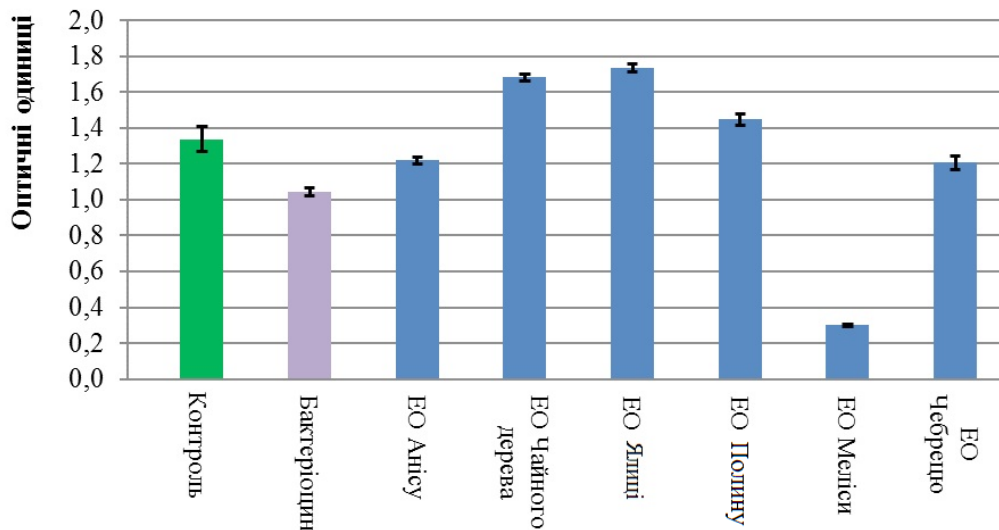


Рис. 1. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Salmonella enterica* NCTC 6017

Fig. 1. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Salmonella enterica* NCTC 6017



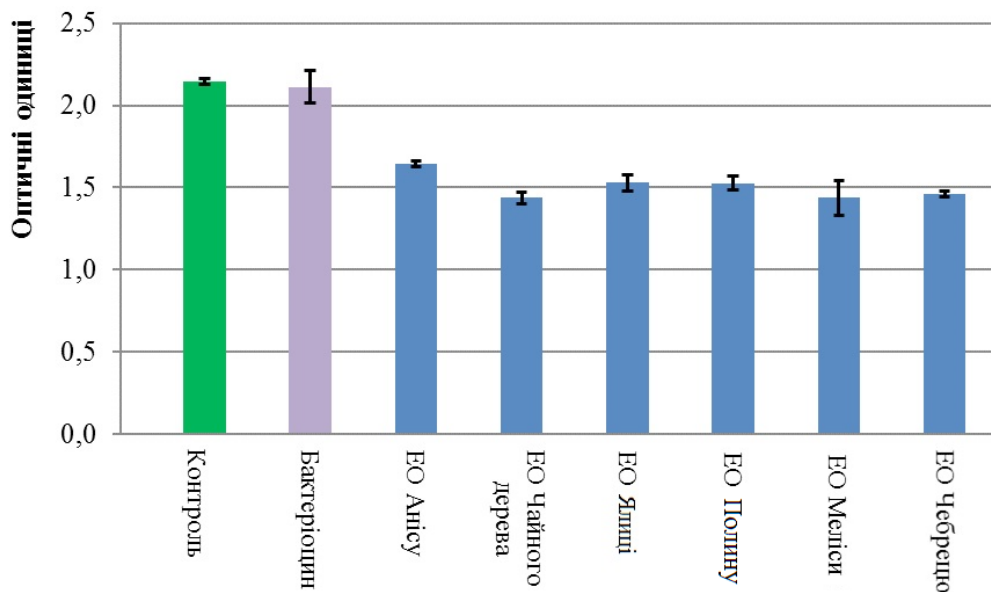


Рис. 2. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Fig. 2. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

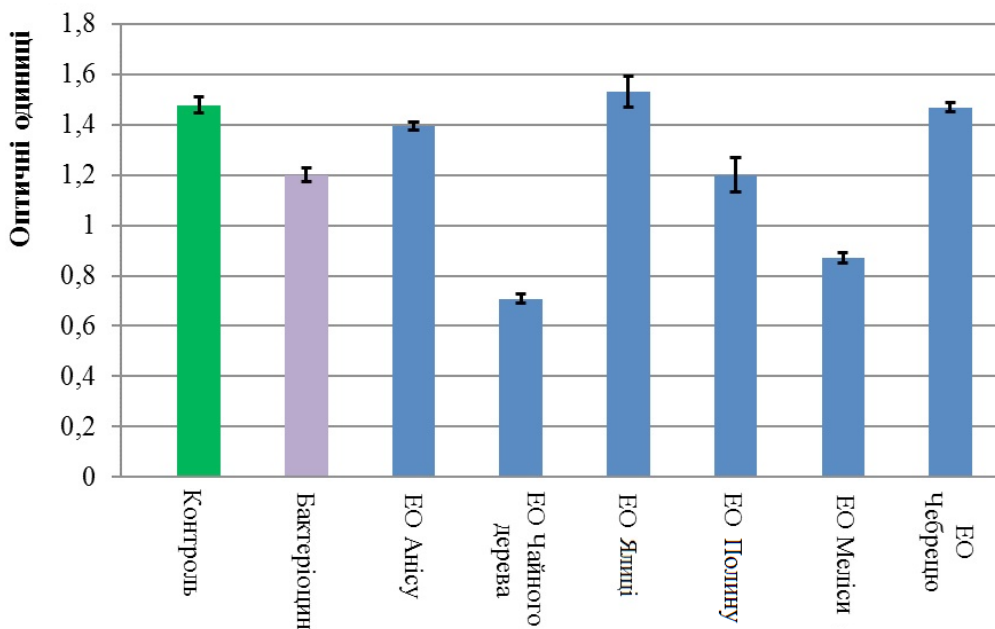


Рис. 3. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Pseudomonas putida* KT 2440

Fig. 3. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Pseudomonas putida* KT 2440

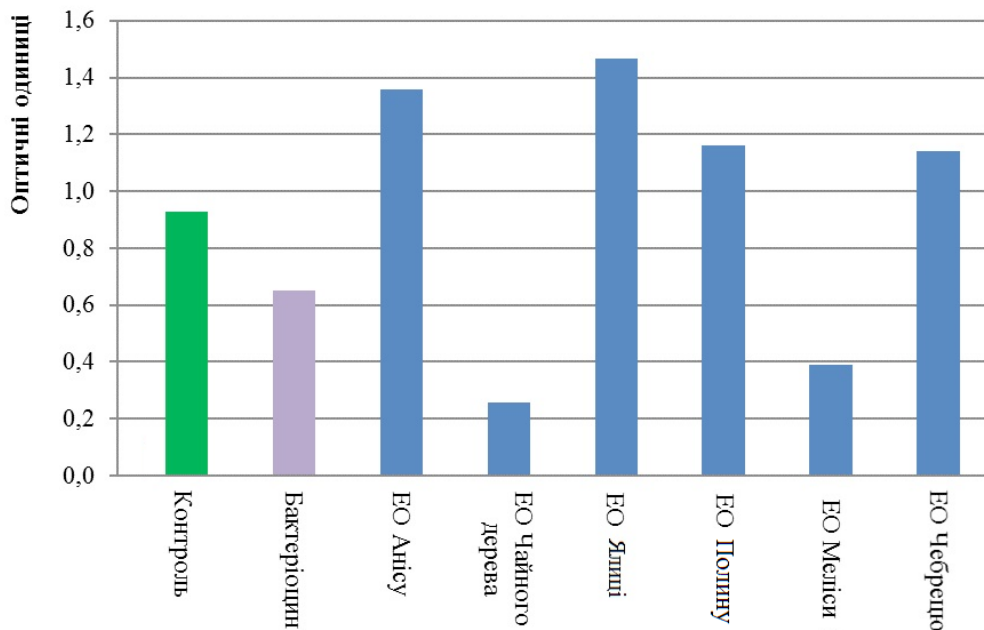


Рис. 4. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

Fig. 4. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

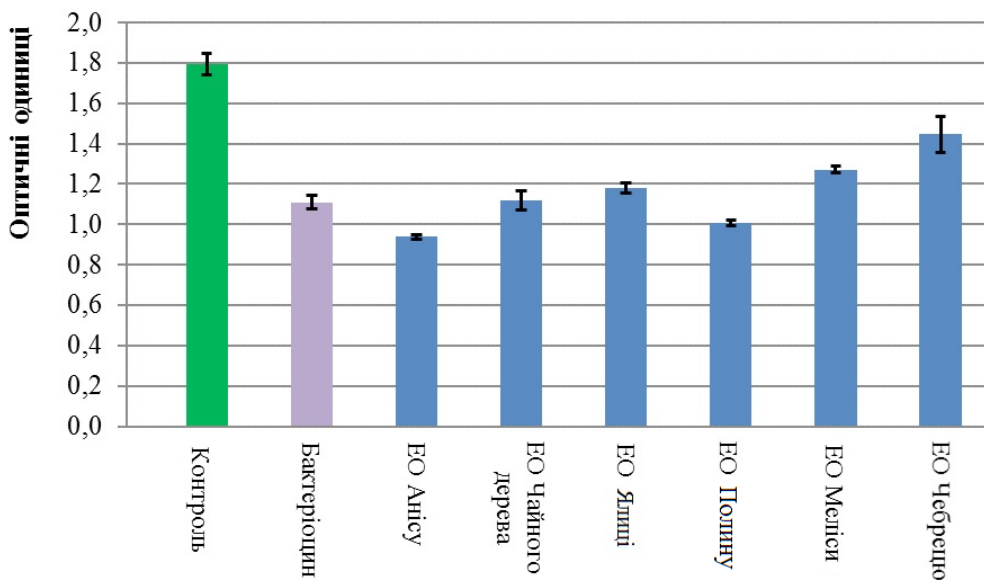


Рис. 5. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Escherichia coli* ATCC 25922

Fig. 5. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Escherichia coli* ATCC 25922



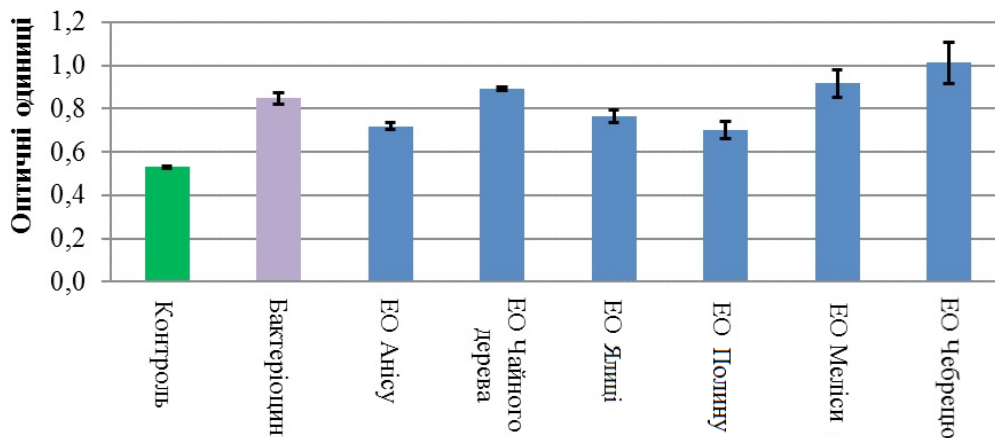


Рис. 6. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Fig. 6. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

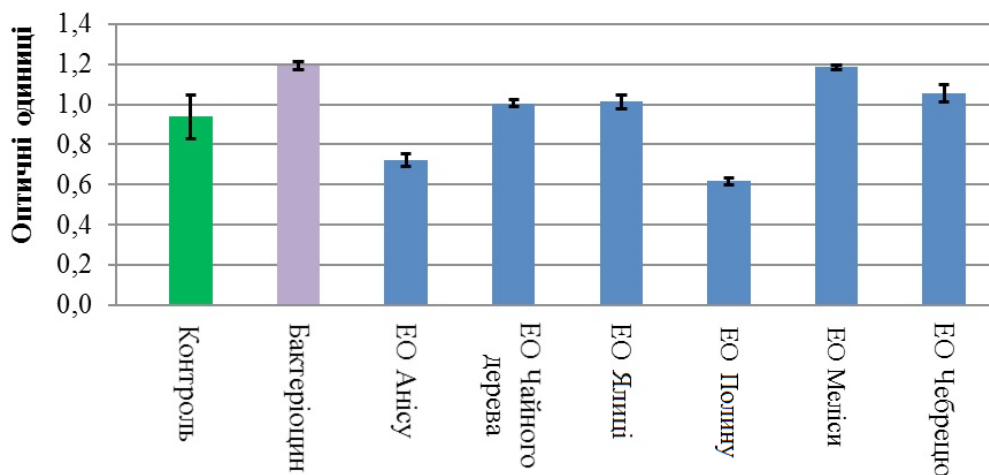


Рис. 7. Вплив ефірних олій та бактеріоцину на показники оптичної густини *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Fig. 7. The effect of essential oils and bacteriocin on the optical density of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Результати визначення індексу фракційної пригнічувальної концентрації за сумісної дії речовин, що тестували, наведені у таблиці 2. Було визначено, що дослідні комбінації ефірних олій та бактеріоцину викликали 4 типи наслідків: 1) ефект синергії – ефект від спільної дії всіх елементів системи, що призводить до збільшення якісних показників функціонування без збільшення кількісних; 2) адитивний ефект – один із видів взаємодії лікарських субстанцій, коли фармакологічний ефект їх комбінації більш виражений, ніж одного з компонентів, але менший за передбачуваний ефект їх суми; 3) ан-

Таблиця 2
 Індекс фракційної пригнічувальної концентрації (FIC) бактеріоцину *E. italicus* ONU 547 у сукупності з ефірними оліями
 Table 2

Fractional inhibitory concentration index (FIC) of bacteriocin *E. italicus* ONU 547 in combination with essential oils

Комбінації сполук	Тест-штами													
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031		<i>S. enterica</i> NCTC 6017		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>P. putida</i> KT 2440		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	D	FIC	D	FIC	D	FIC	D	FIC	D	FIC	D	FIC	D	FIC
ЕО Анісу лікарського + бактеріоцин	0,86	I	1,43	A	1,27	AD	2,18	I	1,54	AD	0,67	I	0,71	I
ЕО Чайного дерева + бактеріоцин	1,32	AD	1,58	A	1,73	AD	2,02	I	1,70	A	0,48	I	0,54	I
ЕО Полину солянковидного + бактеріоцин	1,31	AD	1,73	A	1,78	AD	2,07	I	1,73	AD	0,72	I	1,18	AD
ЕО Ялиці сибірської + бактеріоцин	1,05	I	1,51	A	1,47	AD	2,06	I	1,74	AD	0,62	I	0,93	AD
ЕО Меліси лікарської + бактеріоцин	1,55	AD	1,86	A	1,42	A	1,70	I	1,70	A	1,01	AD	0,82	I
ЕО Чебрецю садового + бактеріоцин	1,47	AD	1,74	A	1,66	AD	1,48	S	1,96	AD	1,10	AD	1,34	AD

Примітка: D – оптична щільність; AD – адитивний ефект; S – синергічний ефект; I – інтерактивний ефект; A – антагоністичний ефект



тагоністичний ефект – вид взаємодії речовин, внаслідок якої ефекти однієї з них (чи обох) зменшуються або втрачаються; 4) відсутність ефекту взаємодії (інтерактивний ефект).

Як видно з наведених даних, сукупна дія бактеріоцину та ЕО Анісу лікарського (*Anisum officinalisa*) спричиняла адитивний ефект до індикаторних штамів *S. enterica* NCTC 6017 та *P. putida* КТ 2440) та антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031. Не спостерігали інтерактивного ефекту до *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 і *S. aureus* ATCC 25923

Сукупна дія дослідного бактеріоцину та ЕО Чайного дерева (*Anisum officinalisa*) викликала адитивний ефект по відношенню до *E. coli* ATCC 25922 та *S. enterica* NCTC 6017; антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031 та *P. putida* КТ 2440, та не викликала інтерактивного ефекту до *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 і *S. aureus* ATCC 25923.

Спільний вплив бактеріоцину та ЕО Полину солянковидного (*Artemisia salsoloides*) викликав адитивний ефект до *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* NCTC 6017, *S. aureus* ATCC 25923 та *P. putida* КТ 2440; антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031, та не викликала інтерактивного ефекту до *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *E. faecalis* ATCC 29212.

Сумісна дія бактеріоцину та ЕО Ялиці сибірської (*Abies sibirica*) спричиняла адитивний ефект до *S. enterica* NCTC 6017, *P. putida* КТ 2440 та *S. aureus* ATCC 25923; антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031, та не спричиняла інтерактивного ефекту до *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212 і *E. coli* ATCC 25922.

Спільний вплив бактеріоцину та ЕО Меліси лікарської (*Melissa officinalis*) спричиняв адитивний ефект до *E. coli* ATCC 25922 та *E. faecalis* ATCC 29212; антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031, *S. enterica* NCTC 6017 та *P. putida* КТ 2440 та не спричиняв інтерактивного ефекту до *P. aeruginosa* ATCC 27853 і *S. aureus* ATCC 25923.

Сукупна дія дослідного бактеріоцину та ЕО Чебрецю садового (*Thymus vulgaris*) спричиняла адитивний ефект до *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* NCTC 6017, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 та *P. putida* КТ 2440; антагоністичний ефект до *K. pneumoniae* ATCC 10031 та синергічний ефект до *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Таким чином було показано, що більшість дослідних природних ефірних олій викликає пригнічення росту індикаторних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів. Максимальний антимікробний ефект до індикаторних штамів продемонстрували ефірні олії Анісу лікарського та Меліси лікарської, які пригнічували ріст *E. coli* ATCC 25922, *S. enterica* NCTC 6017, *P. putida* КТ 2440, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *K. pneumoniae* ATCC 10031 більше ніж на 50,0%.

Ефірні олії мають величезний комерційний потенціал на світовому ринку завдяки своїм унікальним смаковим і ароматичним властивостям, а також біологічній активності [8]. Нашими дослідженнями підтверджено протимікробну дію хімічних компонентів природних ефірних олій, що висвітлено в літературних джерелах [10]. Крім того, отримані результати продемонструва-



ли синергічний ефект будь-яких двох або більше інгредієнтів ефірних олій проти різних патогенів людини, що підтверджують публікації низки авторів [11, 13, 14, 16].

При дослідженні сукупної антимікробної дії бактеріоцину *Enterococcus italicus* ONU 547 та ефірних олій було показано, що такий спільний вплив спричиняє здебільшого синергічний або адитивний ефекти. Ці результати надають підставу для подальшої розробки комбінацій ефірних олій та бактеріоцинів або бактеріоціногенних штамів з метою використання у харчових та фармацевтичних біотехнологіях.

**N. Yu. Vasylieva, G.V. Yamborko, A.G. Merlich,
I. V. Strashnova, I.P. Metelitsina**

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

THE EFFECT OF BACTERIOCIN *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU 547 AND ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Summary

Purpose. To evaluate the effectiveness of bacteriocin of *Enterococcus italicus* ONU 547 and essential oils individually and in combination against indicator strains of opportunistic pathogens. **Methods.** The antagonistic activity of essential oils and bacteriocin was determined by the optical density of the bacterial suspension of test strains (*Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). The index of fractional inhibitory activity (FIC) was calculated by adding the FIC values of bacteriocin *E. italicus* ONU 547 and the studied essential oils. **The results.** The maximum antimicrobial effect was caused by the essential oils of *Anisum officinalis* and *Melissa officinalis*, which suppressed the growth of test strains more than 50.0%. When using bacteriocin of *E. italicus* ONU 547 suppression of viability of indicator strains did not exceed 30.0%. Experimental combinations of essential oils and bacteriocin caused 4 types of consequences: synergy effect; additive effect; antagonistic effect; interactive effect (no interaction effect). In most cases, the combined action of bacteriocin and essential oils caused an additive effect. **Conclusions.** This study demonstrated the potential of using different combinations of natural antimicrobial compounds. The obtained results provide grounds for further development and optimization of combinations of essential oils and probiotic strains of microorganisms for use in food and pharmaceutical biotechnology.

Key words: antimicrobial activity, essential oils, bacteriocin



**Н.Ю. Васильева, А.В. Ямборко, А.Г. Мерлич,
И.В. Страшнова, И.П. Метелицина**

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

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНА *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ONU 547 И ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА РОСТ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Реферат

Цель. Оценить влияние бактериоцина *Enterococcus italicus* ONU 547 и эфирных масел по отдельности и в комбинации к тест-штаммам условно-патогенных микроорганизмов. **Методы.** Антагонистической активностью бактериоцинов и эфирных масел определяли по показателю оптической плотности суспензии бактерий тест-штаммов (*Salmonella enterica* NCTC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas putida* КТ 2440, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923). Индекс фракционной ингибирующей активности (FIC) рассчитывали путем сложения значений FIC бактериоцина *E. italicus* ONU 547 и исследованных эфирных масел. **Результаты.** Максимальный антимикробный эффект вызывали эфирные масла Аниса лекарственного (*Anisum officinalis*) и Мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis*), которые подавляли рост тест-штаммов более чем на 50,0%. При использовании бактериоцина *E. italicus* ONU 547 угнетение жизнеспособности индикаторных штаммов не превышало 30,0%. Опытные комбинации эфирных масел и бактериоцина вызывали 4 типа последствий: эффект синергии; аддитивный эффект; антагонистический эффект; интерактивный эффект (отсутствие эффекта взаимодействия). В большинстве случаев совокупное действие бактериоцина и эфирных масел вызвало аддитивный эффект. **Выводы.** Это исследование продемонстрировало потенциал использования различных комбинаций природных противомикробных соединений. Полученные результаты дают основания для дальнейшей разработки и оптимизации комбинаций эфирных масел и пробиотических штаммов микроорганизмов с целью использования в пищевых и фармацевтических биотехнологиях.

Ключевые слова: антимикробная активность, эфирные масла, бактериоцин

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Крюков В.С., Глебова И.В. Антибактериальное действие эфирных масел лекарственных растений (обзор) // Проблемы биологии продуктивных животных – 2017. – Т. 3. – С. 5–25.
2. Acamovic T., Brooker J.D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effect in animal // Proc. Nutr. Soc. – 2005. – V. 64. – P. 403–412.
3. Akhtar M.S., Degaga B., Azam T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a re-



- view // Biological Sciences and Pharmaceutical Research. – 2014. – V. 2, № 1. P. 1–7.
4. Gaaloul N., Braiek O.B., Berjeaud J.M., Arthur T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus Italicus* GGN10 strain isolated from tunisian bovine raw milk // Journal of Food Safety. – 2014.– V. 34, № 4. – P. 300–311.
 5. Gillor O., Etzion A., Riley M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V.81, № 4. – P. 591–606.
 6. Hammer K. A., Carson C.F., Thormar H. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. – London, UK: John Wiley & Sons, 2011. – P. 255–306.
 7. Hawrelak J.A., Cattley T., Myers S.P. Essential oils in the treatment of intestinal dysbiosis: a preliminary in vitro study // Alternative Medicine Review. – 2009. – V. 14, № 4. – P. 380–384.
 8. Hwanhlem N., Biscola V., El-Ghaish Sh. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L // Probiotics Antimicrob. Proteins. – 2013. – V. 5. – P. 264–278.
 9. Iseppi R., Camellini S., Sabia C., Messi P. Combined antimicrobial use of essential oils and bacteriocin bacLP17 as seafood biopreservative to control *Listeria monocytogenes* both in planktonic and in sessile forms // Res Microbiol. – 2020. – V.171, № 8. – P. 351–356.
 10. Joy B., Raja A., Abraham E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium* // Phytotherapy Research. – 2007. – V. 21, № 5. – P. 439–443.
 11. Koch C., Reichling J., Schnitzler P. Essential oils inhibit the replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) // Botanical Medicine in Clinical Practices. – Wallingsford, Calif, USA: CABI, 2008. – C. 192–197.
 12. Koroch A., Juliani H.R., Zygadlo J.A. Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger R. G., editor // Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. – Berlin, Germany: Springer, 2007. – P. 87–115.
 13. LeBel G., Vaillancourt K., Bercier P., Grenier D. Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and in vitro biocompatibility of essential oil // Arch. Microbiol. – 2019. – V. 201, № 6. – P. 833–840.
 14. Merlich A., Galkin M., Choiset Y., Limanska N., Vasylieva N., Ivanytsia V., Haertlé T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage // Folia Microbiologica. – 2019. – V. 64, № 4. – P. 535–545
 15. Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria // Pharmaceuticals. – 2013. – V.6, № 12. – P. 1451–1474.
 16. Pasqua R. Di., De Feo V., Villani F., Mauriello G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria // Annals of Microbiology. – 2005. – V. 55, № 2. – P. 139–143.



17. Pourghanbari G., Nili H., Moattari A., Mohammadi A., Iraji A. Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2) // *Virus Disease*. – 2016. – V. 27, № 2. – P. 170–178.
18. Karmakar S., Khare R. S., Ojha S., Kundu K., Kundu S. Development of Probiotic Candidate in Combination with Essential Oils from Medicinal Plant and Their Effect on Enteric Pathogens: A Review // *Gastroenterol Res Pract*. – 2012. – V. 2012. – Article ID 457150.
19. Turgis M., Dang V. K., Dupont C., Lacroix M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria // *Food Research International*. – 2012. – V. 48, № 2. – P. 696–702
20. Yang C., Chowdhury M., Huo Y., Gong J. Phytogetic compounds as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application // *Pathogens*. – 2015. – V. 4, № 1. – P. 137–156.

REFERENCES

1. Kryukov VS, Glebova IV. Antibacterial action of essential oils of medicinal plants (review). *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*. 2017;3:5–25. [In Russian].
2. Acamovic T, Brooker JD. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effect in animal. *Proc. Nutr. Soc.* 2005; 64:403–412.
3. Akhtar MS, Degaga B, Azam T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2014; 2(1):1–7.
4. Gaaloul N, Braiek OB, Berjeaud JM, Arthur T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus Italicus* GGN10 strain isolated from tunisian bovine raw milk. *Journal of Food Safety*. 2014;34(4): 300–311.
5. Gillor O, Etzion A, Riley M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;81(4): 591–606.
6. Hammer KA, Carson CF, Thormar H. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. London, UK: John Wiley & Sons, 2011, 255–306.
7. Hawrelak JA, Cattley T, Myers SP. Essential oils in the treatment of intestinal dysbiosis: a preliminary in vitro study. *Alternative Medicine Review*. 2009;14(4):380–384.
8. Hwanhlem N, Biscola V, El-Ghaish Sh. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2013;5:264–278.
9. Iseppi R, Camellini S, Sabia C, Messi P. Combined antimicrobial use of essential oils and bacteriocin bacLP17 as seafood biopreservative to control *Listeria monocytogenes* both in planktonic and in sessile forms. *Res. Microbiol.* 2020;171(8):351–356.
10. Joy B, Raja A, Abraham E. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Hedychium coronarium*. *Phytotherapy Research*. 2007;21(5):439–443.



11. Koch C, Reichling J, Schnitzler P. Essential oils inhibit the replication of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2). *Botanical Medicine in Clinical Practices*. Wallingford, Calif, USA: CABI, 2008, 192–197.
12. Koroch A, Juliani HR, Zygadlo JA. Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger R. G., editor. *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berlin, Germany: Springer, 2007, 87–115.
13. Le Bel G, Vaillancourt K, Bercier P, Grenier D. Antibacterial activity against porcine respiratory bacterial pathogens and in vitro biocompatibility of essential oil. *Arch. Microbiol.* 2019;201(6): 833–840.
14. Merlich A, Galkin M, Choiset Y, Limanska N, Vasylieva N, Ivanytsia V, Haertlé T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. *Folia Microbiologica*. 2019; 64(4):535-545
15. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 2013;6(12):1451–1474.
16. Pasqua RDi, De Feo V, Villani F, Mauriello G. In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*. 2005; 55(2):139–143.
17. Pourghanbari G, Nili H, Moattari A, Mohammadi A, Iraj A. Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2). *Virus Disease*. 2016;27(2):170–178.
18. Karmakar S, Khare RS, Ojha S, Kundu K, Kundu S. Development of Probiotic Candidate in Combination with Essential Oils from Medicinal Plant and Their Effect on Enteric Pathogens: A Review. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012; 2012:Article ID 457150.
19. Turgis M, Dang VK, Dupont C, Lacroix M. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Research International*. 2012; 48(2):696–702.
20. Yang C, Chowdhury M, Huo Y, Gong J. Phytochemicals as alternatives to in-feed antibiotics: potentials and challenges in application. *Pathogens*. 2015; 4(1):137–156.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2021 р.



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), еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми та віруси.

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностичні 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 автори.

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. №7-5/1, 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 мети 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 рукописи (2 примірники) обсягом до 18 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису 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;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);
 - 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);
 - реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
 - ключові слова (не більше п'яти).
- Реферат англійською мовою:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
 - 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);
 - реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
 - ключові слова (не більше п'яти);
 - Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; список використаної літератури мовою оригіналу цитованої статті, список використаної літератури (Referens) англійською мовою (за вимоги міжнародних наукометричних баз).

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

Враховуючи, що реферат відображає основний зміст статті і використовується в інформаційних, в тому числі автоматизованих системах для пошуку документів та інформації, необхідно дотримуватися певних вимог при його написанні:

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200–250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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 з фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.



Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абрєвіатури 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.

Розділ «Матеріали і методи»:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмольх використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммольх/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

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.

До рисунків мають бути підписи не згруповані з ним і не вставлені в об'єкт рисунка.

Позначення на рисунку мають бути інтегровані в нього, тобто копіюватися разом з рисунком, а не окремими частинами.

Всі ілюстрації мають бути розміщені в файлі рукопису, також обов'язково додані до електронного варіанту у вигляді файлів формату JPEG.

Підписи, а також пояснення, примітки до таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською мовою.

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 використаної літератури

1. Список використаної літератури в оригіналі цитованої статті складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця). 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.

2. Список використаної літератури англійською мовою (Referens), за вимогами міжнародних наукометричних баз.

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

Прізвища, імена та по-батькові авторів, назву цитованого видання (журнал, монографія, збірник тощо) наводять послуговуючись безкоштовними сайтами (<http://www.easybib.com/>, <http://www.bibme.org/>, <http://www.sourceaid.com/>, <https://www.citethisforme.com/>), що дозволяють здійснити переклад з використанням однієї з міжнародних систем транслітерації.

Назви статей наводять англійською мовою.

Порядок подання посилань Referens (список 2) має повністю співпадати зі списком використаної літератури (список 1).

Зразки посилання літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англійські джерела)

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 Е // 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-В92.

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилалитической 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.

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

Стиль шрифту для англomовного варіанту списку джерел – NLM (National Library of Medicine), зразок:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49–53.

Статті в журналах:

DeLong EF, Karl DM. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2015;(437):336–342.

Klochov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

Best RJ. Tomato spotted wilt virus. In: Advances Virus Res Eds Smith KM, Lauffer MA. Academic Press, New York, 1968:65–146.

Speissel B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours. Berlin New York: Springer-Verlag. 1989. 12.

Sastry SK. Seed-borne plant virus diseases. India: Springer, 2013. 327 p.

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, Djourmanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



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 С. О. Остапенко

Підписано до друку 22.09.2021 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 7,15. Тираж 50 пр.
Зам. № 2321.

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
e-mail: druk@onu.edu.ua